

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE
QUITO**

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS
RECURSOS NATURALES**

Trabajo de titulación previo la obtención del título de:
**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

TEMA:
**EVALUACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS
CON HIDROCARBUROS UTILIZANDO *Pseudomonas fluorescens*.**

AUTOR:
MARCO RAFAEL PÉREZ POZO

TUTORA
LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Quito, Abril de 2018

Cesión de derechos de autor

Yo, Marco Rafael Pérez Pozo con documento de identificación N° 1721745626, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens*”, el mismo que ha sido desarrollado por optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Marco Rafael Pérez Pozo

CI: 1721745626

Quito, Abril de 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens*.”, realizado por Marco Rafael Pérez Pozo, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.



.....

Laura Elizabeth Huachi Espín

C.I: 1711113744

Quito, Abril de 2018

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico a mis padres que simplemente me hace llenar de orgullo, confianza y valor y no va haber manera de devolverles lo mucho que me han dado durante toda mi vida. Este trabajo es un logro más que llevo a cabo, y sin lugar a dudas ha sido en gran parte gracias a ustedes; no sé en donde me encontraría de no ser por su apoyo, su compañía y su amor.

Le doy mis sinceras gracias amados padres.

Agradecimiento

Agradezco a Dios, a toda mi familia, por el cariño, amor y apoyo brindado no solo en el desarrollo de este trabajo sino en toda mi formación académica, a la Ing. Laura Huachi, docente de la UPS, por todo el apoyo y colaboración brindada durante el desarrollo y culminación de este proyecto.

Índice

Introducción.....	1
Capítulo 1.....	6
Marco Conceptual.....	6
1.1 Historia del petróleo en Ecuador	6
1.2. Petróleo	7
1.2.1. Clasificación del petróleo	8
1.2.2. Impactos en el suelo causado por el petróleo	8
1.3. Hidrocarburos	9
1.3.1 Hidrocarburos Totales Policíclicos (TPHs)	9
1.3.2. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAPs).....	11
1.4. Efectos ambientales causados por los TPHs y HAPs	13
1.4.1. Efectos sobre el suelo	13
1.4.2. Efecto sobre el agua	13
1.4.3. Efectos sobre el aire	14
1.5. Biorremediación	14
1.5.1. Tipos de biorremediación.....	15
1.5.2. Biorremediación del petróleo en el suelo	15
1.5.3. Géneros de las bacterias utilizadas para la biorremediación de hidrocarburos.....	16
1.5.4. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	18

1.5.5. Rutas metabólicas de degradación de hidrocarburos por <i>Pseudomonas</i>	19
Ruta alk.....	20
Ruta nah.....	21
Ruta xly	21
1.6. Fundamento legal	22
CAPÍTULO XII: límites permisibles.....	22
Capítulo 2.....	26
Metodologías.....	26
2.1. Fase de Campo	26
Georreferenciación de los sitios de muestreo	26
2.2. Muestreo de suelo	27
2.2.1. Muestreo de suelo para análisis físicos químicos.	27
2.2.2. Obtención de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
2.3. Fase del laboratorio	27
2.3.1. Preparación de medios de cultivo empleados.....	27
2.3.2. Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	28
2.3.2.1. Diluciones Seriadas	28
2.3.3. Purificación.....	28
2.3.4. Identificación macroscópica.....	28
2.3.5. Identificación microscópica	29
2.3.6. Identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> por pruebas bioquímicas .	29

2.3.7. Resiembras	29
2.3.8. Conservación de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	30
2.3.9. Inoculación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> al suelo contaminado	30
A. Montaje de las unidades experimentales	30
B. Tratamientos del experimento	31
C. Diseño experimental	31
2.3.9.1. Preparación del inóculo y espectrofotometría.....	32
2.3.9.2. Cuantificación de células por cámara Neubauer	32
2.3.9.3. Inoculación al suelo.....	32
2.4. Variables del experimento.....	33
2.4.1. pH y Conductividad eléctrica	33
2.4.2. Temperatura y Humedad.....	33
2.4.3. Análisis Físico Químicos.....	33
2.4.4. Concentración de HAPs y TPHs	34
Capítulo 3.....	35
3.1. Caracterización macro y microscópica de la carga microbiana del suelo contaminado	35
3.2. Análisis de las variables	43
3.2.1. Potencial de hidrógeno (pH)	43
3.2.2. Conductividad eléctrica (C.E).	46
3.2.3. Temperatura	49
3.2.4. Humedad	51

3.3. Medición de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en peso seco iniciales y finales.	53
3.4. Medición de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en peso seco.....	56
Conclusiones.....	59
Recomendaciones	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXOS.....	71

Índice de tablas

Tabla 1. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria Hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio.....	24
Tabla 2. Criterios de remediación o restauración de suelos.....	25
Tabla 3. Tratamientos aplicados en la unidad de experimentación durante la investigación	31
Tabla 4. Parámetros analizados y su metodología.	34
Tabla 5. Caracterización macroscópica de la carga microbiana del suelo contaminado	35
Tabla 6. Caracterización microscópica de <i>Trichoderma</i> sp	37
Tabla 7. Características macroscópicas de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	39
Tabla 8. Caracterización microscópica de <i>Pseudomonas fluorescens</i> por el método de Tinción Gram	41
Tabla 9. Identificación de <i>Pseudomona fluorescens</i> por pruebas Bioquímicas	42
Tabla 10. Análisis de la Varianza para la variable pH y Tukey al 5%.....	43
Tabla 11. Análisis de varianza para la variable C.E. y Tukey al 5 %.	46
Tabla 12. Análisis de varianza para la variable temperatura y Tukey al 5%.	49
Tabla 13. Análisis de varianza para la variable humedad y Tukey al 5%.	51
Tabla 14. Promedio de degradación de HAPs iniciales y finales biorremediados....	53
Tabla 15. TPHs iniciales y finales.....	56

Índice de anexos

Anexo 1. Propiedades de los 16 HAPs más peligrosos	71
Anexo 2. Requerimientos para la biorremediación	72
Anexo 3. Conceptos y estrategias de biorremediación (In situ)	73
Anexo 4. Conceptos y estrategias de biorremediación (Ex situ)	74
Anexo 5. Ruta metabólica de TPHs por Pseudomonas.....	75
Anexo 6. Ruta metabólica de HAPs por Pseudomonas	76
Anexo 7. Preparación de Agares empleados.....	77
Anexo 8. Método KJELDAHL para “Determinación de Nitrógeno y Materia orgánica”	78
Anexo 9. Método Olsen modificado	80
Anexo 10. Cationes de cambio “Ca, Mg, K, Na”	81
Anexo 11. Métodos EPA	83
Anexo 12. Resultado de análisis físico químico del suelo sano	86
Anexo 13. Resultado de análisis físico químico del suelo contaminado	87
Anexo 14. Resultado de análisis físico químico del suelo Biorremediado.....	88
Anexo 15. Resultados de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) e Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en peso seco del suelo contaminado al inicio del ensayo.....	89
Anexo 16. Resultados de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) e Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en peso seco del suelo contaminado al final del ensayo evaluado por tratamiento con sus respectivas repeticiones.....	90
Anexo 17. Fotografías del ensayo.....	102
Anexo 18. Datos de variable analizadas	106

Resumen

Desde que se descubrieron los hidrocarburos, su uso en las industrias ha provocado impactos ambientales severos, los cuales se han presentándose de manera frecuente en varias partes de la Amazonía Ecuatoriana. En la presente investigación se evaluó la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas fluorescens* por bioaumentación en suelos de la Amazonía Ecuatoriana contaminados con HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) y TPHs (Hidrocarburos Totales de Petróleo).

La bioaumentación, es una alternativa eficiente para este tipo de ensayos, por lo cual, se implementó para verificar su eficacia en suelos contaminados de la Amazonía.

El proyecto se llevó a cabo en dos fases: campo y laboratorio. Se aplicó un DBCA (diseño de bloques completos al azar) con cuatro tratamientos: T0 (Suelo + Hidrocarburo+ 150mL de agua), T1 (Suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁴ UFC/mL”), T2 (suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁶ UFC/mL”) y T3 (suelo con hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁸ UFC/mL”), con tres repeticiones.

Al finalizar la investigación se evidenció que las tres concentraciones de *P. fluorescens* degradaron TPHs y HAPs; sin embargo, T3 resultó ser el mejor tratamiento con una degradación del 99,25 % para HAPs y 97,50% para TPHs, demostrando que la bioaumentación utilizando *P. fluorescens* es efectiva para la degradación de hidrocarburos.

Palabras claves: bioaumentación, contaminación, metabolitos, NADH, dioles.

Abstract

Since the discovery of hydrocarbons, their use in industries has caused severe environmental impacts, which have been occurring frequently in various parts of the Ecuadorian Amazon. In the present investigation the biodegradation capacity of *Pseudomonas fluorescens* was assessed by bioaugmentation in soils of the Ecuadorian Amazon contaminated with PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) and TPHs (Total Petroleum Hydrocarbons).

The bioaugmentation, is an efficient alternative for this type of tests, for which, it was implemented to verify its effectiveness in contaminated soils of the Amazon.

The project was carried out in two phases: field and laboratory. A DBCA (randomized complete block design) was applied with four treatments: T0 (Soil + Hydrocarbon + 150mL of water), T1 (Soil + hydrocarbon + 150mL of *Pseudomonas fluorescens* "104 CFU / mL"), T2 (soil + hydrocarbon + 150mL of *Pseudomonas fluorescens* "106 CFU / mL") and T3 (soil with hydrocarbon + 150mL of *Pseudomonas fluorescens* "108 CFU / mL"), with three repetitions.

At the end of the investigation it was evidenced that the three concentrations of *P. fluorescens* degraded TPHs and HAPs; however, T3 was the best treatment with a degradation of 99,25% for HAPs and 97,50% for TPHs, demonstrating that bioaugmentation using *P. fluorescens* is effective for the degradation of hydrocarbons.

Keywords: bioaugmentation, contamination, metabolite, NADH, diols.

Introducción

La explotación de petróleo es uno de los sistemas más importantes de producción del Ecuador y constituye la principal fuente de ingresos para la economía local. En el sector ambiental los procesos extractivos de exploración, explotación, refinación y producción generan impactos ambientales negativos que afectan a la calidad del medio ambiente y se manifiestan en la contaminación del suelo, del aire, de los recursos hídricos, entre otros. Todos estos procesos están relacionados a los problemas globales como la reducción de la capa de ozono, pérdida de la biodiversidad, aumento excesivo de la contaminación atmosférica, desertización, que en conjunto aumentan el efecto invernadero e inducen al aceleramiento del cambio climático global (Narváez, 2009).

La contaminación producida por TPH (Hidrocarburos Totales Policíclicos) y HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) depende de la mezcla de hidrocarburos que se encuentra en el petróleo, además de factores ambientales de la zona en la cual existe la contaminación (Registry Agency for toxic substances and disease, 1999).

El conocimiento de las nuevas tecnologías ha hecho énfasis en el desarrollo y aplicación de nuevas estrategias de remediación sostenibles. Esto ha llevado a pensar en la biorremediación como una técnica eficaz para la descontaminación por medio de la biodegradación microbiana utilizando estrategias como la bioaumentación, que se basa en la adición externa de microorganismos degradadores.

La biorremediación nace como una alternativa para solventar estos problemas de contaminación y se basa en la capacidad que tienen los microorganismos para degradar compuestos tóxicos a partir de sustancias contaminantes, algunos de ellos son capaces de degradar estos contaminantes a dióxido de carbono, agua y otros productos más sencillos para el medio ambiente (Ortiz, 2005).

La técnica de biorremediación radica en el uso de microorganismos (autóctonos o exógenos) como bacterias, hongos, plantas, algas entre otros, con potenciales metabólicos capaces de desintoxicar o neutralizar ciertos materiales tóxicos de un ambiente transformándolos en sustancias menos tóxicas, capaces de eliminarlas por métodos más factibles. Es una técnica que aumenta los niveles aeróbicos de la degradación, el cual es un proceso natural del suelo. Benavides, y otros (2006).

*“El proceso de biorremediación de hidrocarburos por *Pseudomonas fluorescens*, está condicionado por una serie de factores entre los cuales existen bióticos y abióticos tales como: los nutrientes, pH, humedad, temperatura, conductividad eléctrica y respiración propia del microorganismo, los cuales al ser modificados reducen o aumentan la capacidad metabólica de la bacteria y su adaptabilidad con el cambio de posición de los ácidos grasos de la membrana celular.”* (Constitución de la República del Ecuador, 2013).

La biorremediación ha demostrado ser una tecnología eficiente para el tratamiento de contaminación con TPHs y HAPs ya que la mayor parte de los compuestos del crudo y sus derivados son biodegradables.

Pseudomonas fluorescens, es un bacilo Gram negativo, que se encuentra generalmente en el suelo y el agua, estos organismos resultan ser una opción viable en procesos de biorremediación, debido a que son capaces de utilizar el hidrocarburo como fuente de carbono para sus procesos metabólicos generando al final productos más sencillos para ser fácilmente incorporados en los ciclos biogeoquímicos (Gómez, y otros, 2008).

La degradación aeróbica de hidrocarburos empieza por la acción de dioxigenasas las cuales catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno y dos electrones desde el NADH para formar dioles (cis di hidrodioles) (Izquierdo, 2013).

En la mayoría de suelos contaminados con hidrocarburos la mayor parte de los compuestos alifáticos se volatilizan, mientras que los compuestos policíclicos aromáticos HAPs permanecen, generando un impacto negativo en virtud de los efectos tóxicos y recalcitrantes para el medio ambiente y salud de los seres vivos Gómez, y otros (2008).

El plan del buen vivir menciona que el uso de microorganismos o de la biorremediación de suelos contaminados utilizando organismos vivos es una técnica que favorecería al Buen Vivir, considerando que, el artículo 14 de la (Constitución de la República del Ecuador, 2013) reconoce que:

“El derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y sumak kawsay, la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados. Manteniendo un ambiente sano y sustentable que garantice a las personas y colectividades el acceso equitativo, permanente de calidad al agua, aire y suelo, y a los beneficios de los recursos del subsuelo y del patrimonio natural”.

El objetivo general de esta investigación es determinar la reducción de TPHs y HAPs en suelos contaminados con hidrocarburos, mediante la técnica de biorremediación con *Pseudomonas fluorescens*. Los objetivos específicos pretenden caracterizar la carga microbiana del suelo contaminado, realizar el análisis físico- químico del suelo

al inicio y al final del proyecto, determinar la concentración de TPHs y HAPs presentes en las muestras de suelo contaminado, evaluando la eficacia de tres concentraciones de *Pseudomonas fluorescens* en suelos contaminados con hidrocarburos.

Se plantearon dos hipótesis, la alternativa (Ha) que establece que *P. fluorescens* degrada TPHs y HAPs de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos y la nula (Ho) que establece que *P. fluorescens* no podrá biodegradar TPHs y HAPs de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos.

La fase de campo se realizó en la provincia Orellana Ciudad Francisco de Orellana más conocida como “El Coca”, que es considerada una importante zona productora de petróleo. Mediante georreferenciación se determinaron los lugares de muestreo y con la técnica de tresbolillo se recolectaron las muestras de suelo para el análisis de cuantificación de TPHs y HAPs.

La fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cayambe, donde se analizó las propiedades físicas químicas del suelo amazónico. La cuantificación de los TPHs y HAPs en las muestras de suelo contaminado se la realizó por cromatografía de gases con detector de espectroscopia de masas en el laboratorio Gruntec Environmental Services.

En los laboratorios de Ciencias de la Vida en la Universidad Politécnica Salesiana, campus El Girón, se realizaron procedimientos de aislamiento (cultivo, diluciones, y caracterización de las cepas) por medio de técnicas microbiológicas pertinentes para la especie.

Se empleó un diseño completamente al azar basado en un DBCA con 3 repeticiones y 3 tratamientos; T0 (Suelo + Hidrocarburo), T1 (Suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁴ UFC/mL”), T2 (suelo + hidrocarburo + 150mL de

Pseudomonas fluorescens “ 10^6 UFC/mL”) y T3 (suelo con hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “ 10^8 UFC/mL”). Donde las variables evaluadas fueron: concentración de TPHs y HAPs y concentración de *Pseudomonas fluorescens* pre y post tratamientos, pH, conductividad eléctrica, humedad, temperatura.

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1 Historia del petróleo en Ecuador

La historia de la explotación hidrocarburífera en Ecuador comienza en el año 1878, específicamente en la Provincia de Santa Elena, donde se empezó a realizar las primeras investigaciones para identificar si existía presencia de crudo en ese yacimiento, posteriormente después de casi 33 años se da inicio a los distintos procesos extractivos, en ese mismo año ocurre la perforación del primer pozo ecuatoriano en la Península de Santa Elena, al cual se lo llamo ANCON 1. Posteriormente en 1919 se funda en Londres la empresa ANGLOU ECUADORIAN OILDFIELDS LIMITED, quién será encargada de procesos de exploración en la península de Santa Elena (Siguenza, 2007).

Al término del año 1961 la empresa ANGLOU, afirma que los yacimientos de la Península se encuentran agotados y que ya no son rentables. Posterior a esto en los años 1967 ocurre la explotación petrolera en la Amazonía, con el primer pozo llamado LAGO AGRÍO 1 de la compañía TEXACO GULF, produciendo 2700 barriles diarios, dando inicio así al bum petrolero ecuatoriano (Siguenza, 2007).

Ese mismo año se crea la corporación CEPE (Corporación Estatal Petrolera Ecuatoriana), que se encarga de la explotación, industrialización y comercialización del crudo. En 1989 se crea la empresa Petroecuador la cual remplazó a CEPE con seis filiales, tres permanentes (Petroproducción, Petrocomercial y Petroindustrial) y tres temporales (Petropenínsula, Petroamazonas y Petrotransporte (Silva, 2013).

Actualmente Petroamazonas nace como empresa estatal después de la deserción de Petroecuador y es la encargada de extraer el petróleo en Ecuador; produce 360,000

barriles diarios, aplicando tecnologías de bajo impacto ambiental, tales como evitar la construcción de carreteras y helipuertos en las zonas donde se dan a cabo los procesos de exploración y perforación para no perderla biodiversidad causada por la cacería, la tala ilegal de madera y la colonización de parques nacionales (Larrea, 2013).

1.2. Petróleo

El Petróleo es un recurso natural no renovable, que se forma por la degradación anaerobia de los componentes orgánicos por largos periodos de tiempo y determinadas condiciones ambientales, está formado por una mezcla de varios hidrocarburos (parafínicos, aromáticos y naftalénicos). La composición de crudo es: Carbono 83-87%, Hidrógeno: 11-14%, Oxígeno: 0-1%, Azufre: 0,2-5%, Nitrógeno: 0-5% y otros componentes en menor cantidad; estas proporciones varía según el yacimiento de donde se extrae el petróleo y la cantidad de grados API (medida de densidad). El grado API es la unidad de medida americana para representar la densidad del petróleo y sus derivados, precisa cuan liviano o pesado es el petróleo. A mayor cantidad de grados API el crudo presenta mejor calidad (Gary, 1980); (Gavilanez, 2013).

El petróleo es la fuente más importante de la energía del planeta donde gracias a este recurso natural mediante distintos procesos de refinación y producción se puede llegar a obtener gasolina y un sin número de combustibles, que permiten mover maquinas como automóviles, plantas eléctricas, etc.; también se puede producir asfaltos para la construcción de carreteras y un sin número de derivados necesarios en la vida diaria ; por esta razón se recalca que es el recurso no renovable más importante a nivel internacional (Torres, 2009). Es el recurso más importante dentro de la economía ecuatoriana y no solamente debido a que es una fuente natural dentro del sector

estratégico, sino también porque es una fuente de energía, trabajo y la principal fuente de ingresos del país.

Actualmente, uno de los problemas ambientales es la contaminación de ecosistemas terrestres por derrames de hidrocarburos, principalmente del petróleo y sus derivados, que ocurren en actividades de explotación y transporte de los mismos.

1.2.1. Clasificación del petróleo

El petróleo se clasifica acorde a la naturaleza química propia del crudo, su densidad en grados API, cuyo valor es determinado por el (American Petroleum Institute) y por su contenido de azufre, el cual lo hará que sea de un alto o bajo costo (Kraus, 2012).

El petróleo ligero es el crudo con bajo contenido de ceras que presenta una gravedad API mayor a 31,1 °; el crudo semi pesado presenta una gravedad API entre 22,3 y 31,1 °API; el crudo pesado es el que no fluye con facilidad debido a que su densidad o peso específico es superior a la del crudo semi pesado con una gravedad API inferior a 20 ° y el crudo extra pesado es el crudo que presenta una gravedad inferior a 10 ° API.

Se denomina crudo dulce al petróleo que contiene menos del 0,5% de azufre, mismo que contiene cantidades mínimas de dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno, es procesado para hacer gasolina y tiene una gran demanda en las zonas industrializadas (Salvador & Fernandez, 2012); (Ingeniería Energética General, 2013).

1.2.2. Impactos en el suelo causado por el petróleo

La incorporación de petróleo en el suelo genera una alteración de la composición original, donde se implantan las especies vegetales dejando suelos inutilizables durante años Pardo, Perdomo, & Benavides (2014).

El alto contenido de sal que presenta el petróleo genera gradientes que pueden ocasionar la desnaturalización de las proteínas de los microorganismos por la

destrucción de su estructura secundaria y terciaria, y la deshidratación de células microbianas inmersa en el suelo contaminado Benavides, y otros (2006).

En cuanto a la concentración de iones hidrógeno (pH) se ve disminuido por la formación de ácidos orgánicos, acaparamiento del carbono orgánico, aumento de Fe y Mn intercambiable (Buendía, 2012).

1.3. Hidrocarburos

Es un compuesto orgánico constituido principalmente por Carbono e Hidrógeno, el cual puede presentarse de manera líquida, sólida o gaseosa. Los alcanos son el componente más importante del petróleo, estos compuestos suelen ser reactivos químicos, explosivos o tóxicos. Se clasifican dependiendo al tipo de enlace que presenta la molécula de carbono dentro de las estructuras de los hidrocarburos (Autino, Romanelli, & Ruíz, 2013).

1.3.1 Hidrocarburos Totales Policíclicos (TPHs)

Son una mezcla homogénea de hidrocarburos y se usan para describir una gran familia de varios componentes químicos tóxicos que se originan a partir del petróleo crudo y que pueden contaminar el ambiente. Debido a que hay muchos productos químicos en el petróleo crudo o refinado, no es práctico medir cada uno de estos componentes de forma separada; por ende, se mide la cantidad total de hidrocarburos policíclicos (TPHs) en un sitio determinado (Estrella, 2012).

La degradación de TPHs puede verse afectada por las condiciones ambientales que se presenten en un determinado sitio contaminado, por este motivo es indispensable controlarlas para que la actividad de los microorganismos degradadores sea eficiente (Vallejo, Salgado, & Roldán, 2010).

Entre los diversos factores físicos y ambientales que hay que tomar en cuenta en el lugar del derrame se encuentran: temperatura, la cual tiene influencia directa sobre la naturaleza química y física del petróleo, por esta razón cuando la temperatura es baja la viscosidad del petróleo aumenta, variando de esta manera su solubilidad en agua y disminuyendo la volatilización de distintas fracciones contaminantes y tóxicas que podrían afectar a los microorganismos; cuando la temperatura es alta se incrementa la toxicidad de los contaminantes inhibiendo así la actividad y carga microbiana. El rango apropiado de temperatura intensificará la actividad enzimática de los microorganismos aumentando así su eficiencia en procesos de biorremediación. Otro factor necesario en este proceso degradatorio es la presencia de oxígeno molecular que permite la oxidación de sustratos por las enzimas oxigenasas de los microorganismos y la rápida volatilización de compuestos tóxicos. Por esta razón cuando el contenido de oxígeno en el suelo es bajo se afecta el proceso de degradación (Vallejo, Salgado, & Roldán, 2010).

Estudios realizados afirman que las tasas óptimas para procesos de degradación ocurren cuando la saturación de agua y el potencial hídrico del suelo se encuentran entre el 35% y 90%; en valores inferiores a estos el proceso se ve inhibido. Con respecto al pH estos estudios recalcan que la mayoría de las bacterias heterótrofas se desarrollan en pH cercanos a la neutralidad; por esta razón el pH muy ácido o muy básico afectará de manera negativa a la carga microbiana inhibiendo su comunidad y por ende su capacidad para degradar hidrocarburos (Vallejo, Salgado, & Roldán, 2010). Otros estudios mencionan que el rango óptimo de pH para procesos de biorremediación de lodos que contiene TPHs en suelo se encuentran dentro del rango 5,0 y 7,8. Además del pH y la temperatura, es importante adicionar nutrientes debido a

que son necesarios para el desarrollo de la actividad microbiana “Pardo, y otros, (2014)”.

Adicionalmente, después de un derrame de petróleo, se observa una elevada concentración de carbono y una carencia de nitrógeno y fósforo, los cuales son necesarios para el metabolismo microbiano por este motivo se debe optar por la implementación de estrategias de biorremediación como la bioestimulación o la bioaumentación (Vallejo, Salgado, & Roldán, 2010).

1.3.2. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAPs)

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos, son hidrocarburos orgánicos de dos o más anillos bencénicos que constituyen una fracción importante del petróleo (Patel V, 2012), mismos que se encuentran alineados en forma angular o agrupada. La resonancia (distribución de electrones en los anillos aromáticos bencénicos) es la principal responsable para que estos compuestos sean resistentes a la oxidación tanto química como biológica proporcionándoles una elevada estabilidad, toxicidad y persistencia a este tipo de hidrocarburos (Izquierdo, 2013).

Los HAPs son comúnmente generados por la combustión incompleta de la materia orgánica, de manera natural como antropogénica (incineración de residuos, automóviles, incendios forestales, etc.) (Thion, Beguiristain, & Leyval, 2013).

Cuando los HAPs se depositan en la superficie terrestre se unen a las partículas del suelo, dependiendo del tipo de suelo (contenido de materia orgánica, su composición, su estructura y tipo de HAP contaminante) (Tsibart, 2013), por lo que es la adsorción la que gobierna su movilidad (Shafy & Mansour, 2015). La reducción de la biodisponibilidad de los HAPs con el tiempo representa uno de los desafíos más difíciles en la biorremediación de suelos contaminados, dado que estos compuestos

aromáticos son progresivamente secuestrados y quedan menos disponibles para los microorganismos (Puglisi, 2014).

La contaminación del suelo con HAPs está asociada generalmente a derrames accidentales o a la pérdida de productos derivados del petróleo refinado (Towell, 2011). Generalmente los suelos contaminados con hidrocarburos conllevan en si mezclas complejas de otros hidrocarburos tales como HAP LMW (Low Molecular Weight) (de bajo peso molecular), estos son más volátiles y más solubles en agua que los HAP HMW (High Molecular Weight) (de alto peso molecular) y además son más susceptibles a la degradación. Dentro de este grupo de HAPs se encuentra el fenantreno, naftaleno y antraceno que en su mayor parte están distribuidos en el ambiente. Se los considera HAP debido a que dentro de su núcleo se encuentran un sin número de HAPs carcinógenos de un alto peso molecular (Mallick, Chakraborty, & Dutta, 2011); (Lafortune , Juteau, Déziel, & Villemur, 2009).

Las características físico químicas de los HAPs, son las que condicionan su forma de comportarse en el medio ambiente, estas son la recalcitrancia y la hidrofobicidad, cada una de estas características aumentan según el número de anillos bencénicos que presente la estructura del HAP y son las responsables para que se adsorban en la superficie y dificulte los procesos de biorremediación. Pueden acumularse en la cadena trófica y presentan toxicidad por contacto, inhalación o ingestión, debido a que presentan baja hidrosolubilidad. *Pseudomonas fluorescens* tiene la capacidad de generar metabolitos que actuarán con los HAPs transformarlos en compuestos liposolubles, favoreciendo de esta manera su absorción y su rápida distribución en los tejidos celulares bacterianos, como en el caso del Benzofluoranteno, Benzofluoranteno, Benzopireno, Benzo antraceno, Dibenzo antraceno, que poseen

potencial carcinogénico y mutagénico, ya que se unen con el ADN tras su activación biológica (Salvador & Fernandez, 2012).

Estudios realizados afirman que el HAP más simple es el naftaleno por poseer un par de anillos policíclicos (anillos aromáticos simples unidos), recalando así que cuando aumenta el número de anillos en la molécula del hidrocarburo aumenta su hidrofobicidad y recalcitrancia, siendo menos biodisponibles para su biodegradación. Por otro lado el HAP monocíclico más simple es el benceno o uno de sus derivados y dependiendo del número de anillos que presente en su estructura se lo caracterizará como monocíclico o policíclico (Singleton, Sangaiah, Gold, & Ball, 2015); (Izquierdo, 2013).

En el anexo 1, se muestran las propiedades de los 16 HAPs más peligrosos según la EPA (Kästner, 2008).

1.4. Efectos ambientales causados por los TPHs y HAPs

1.4.1. Efectos sobre el suelo

Los efectos en el suelo se deben principalmente al desmalezado, alisado, desplazamiento y operación de equipos pesados en el terreno; por otra parte los derrames de petróleo producen una alteración del sustrato original en donde se implantan las especies vegetales, dejando suelos inútiles durante muchos años, aumentando así de una manera acelerada la pérdida de la biodiversidad y enfermedades en la población humana que viven cerca al sitio donde se produjo el derrame (Cruz, 2014).

1.4.2. Efecto sobre el agua

Los derrames del petróleo ocasionan una reducción significativa en el contenido de oxígeno disuelto, aporte de sólidos, sustancias orgánicas e inorgánicas. En el caso de

las aguas subterráneas con TPHs y HAPs ocurre un aumento excesivo de la salinidad que afecta a los peces y otras especies marinas que se alimentan de ellos, incluido el ser humano (Serrano, 2015).

1.4.3. Efectos sobre el aire

Los efectos en el aire se deben frecuentemente a que a la hora de extraer el hidrocarburo líquido siempre viene inmerso con gas; el gas natural está constituido por hidrocarburos y puede contener CO, CO₂ y H₂S, si el gas producido en el proceso de extracción tiene estos gases se quema y si el gas producido es dióxido de carbono se ventea. Todo este proceso genera gases quemados que afectan directamente al aire y alteran su composición natural y generando un incremento de TPHs evaporados en el ambiente; pero el problema mayoritario se da cuando se generan gases recalcitrantes como los HAPs, es decir que se transforman e inhibe la degradación microbiana, por esta razón es difícil poder eliminarlos, a menos que sean captados y tratados por un sistema para gases no volátiles (Serrano, 2015).

1.5. Biorremediación

La biorremediación es una técnica que emplea el uso de microorganismos autóctonos o exógenos como plantas, hongos, algas, bacterias entre otros, con potenciales metabólicos capaces de neutralizar materiales tóxicos de un determinado ambiente contaminado y transformarlos en menos tóxicas, capaces de eliminarlos por técnicas más factibles, es una técnica que incrementa las condiciones aeróbicas de la biorremediación, el cual es un proceso natural propio del suelo (Gavilanez, 2013).

El proceso de biorremediación inicia con la oxidación del anillo aromático con la incorporación de dos átomos de O₂ catalizado por una dioxigenasa, de esta reacción se forma un cisdihidrodiol y es aquí cuando anillo pierde o se genera un decremento de la aromaticidad. Posterior a esto una deshidrogenasa NAD⁺ dependiente, reconstruye

el anillo aromático originando un catecol que es un diol. Los dioles son moléculas que producen la ruptura del anillo aromático mediante dioxigenasas estereo selectivas (Gómez, y otros, 2008).

El resultado final del proceso de biorremediación se puede caracterizar en 3 diferentes tipos de formas: (a) La molécula del contaminante se descompone en distintas moléculas, pero si se unen todas las moléculas se tiene como resultado la molécula original, (b) Descomposición de moléculas orgánicas originales convirtiéndose en formas minerales, (c) Cambio simple de una molécula en el contaminante alterando su estructura principal (Willey, Shewood, & Woolverton, 2012).

1.5.1. Tipos de biorremediación

- **Ficorremediación:** Empleo de algas para remoción de contaminantes
- **Micorremediación:** Emplea hongos capaces de degradar sustancias tóxicas.
- **Fitorremediación:** Emplea plantas para absorción y remoción de materiales tóxicos para descontaminar ambientes contaminados.
- **Degradación Enzimática:** Empleo de enzimas producidas por ciertos organismos para la degradación de sustancias contaminantes (Cruz, 2014).

1.5.2. Biorremediación del petróleo en el suelo

La biorremediación de suelos contaminados con petróleo pone en marcha dos métodos alternativos: (a) método anaerobio o (b) método aerobio, pero la mayoría de procesos remediadores se dan por degradación aerobia, hay que recalcar que no todos los hidrocarburos se someten al proceso de degradación de la misma manera, por la razón de que los hidrocarburos no poseen moléculas iguales (Gavilanez, 2013), haciendo

énfasis que estos procesos necesitan de varios procedimientos (Ver anexo 2) para cada proceso de biorremediación se necesita de estrategias como pueden ser ex situ o in situ (Ver anexo 3 y anexo 4).

1.5.3. Géneros de las bacterias utilizadas para la biorremediación de hidrocarburos

Achrornobacter, Acinetobacter, Actinomyces, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Beneckea, Brevebacterium, Coryneformes, Erwinia, Flavobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Leumthrix, Moraxella, Nocardia, Peptococcus, Pseudomonas, Sarcina, Spherotilus, Spirillum, Streptomyces, Vibrio, Xanthomyces (Towell, 2011).

Dentro de este grupo se encuentran las bacterias como *Pseudomonas* que poseen cierta capacidad para degradar dichos contaminantes ya que tienen la destreza de generar surfactantes que son compuestos químicos anfipáticos con la capacidad de reducir la tensión superficial de alguna sustancia, para que las bacterias puedan tener este dicho potencial para la biorremediación es necesario conocer factores como la fisiología de la bacteria, entorno ambiental que se encuentra el contaminante y composición de las moléculas del petróleo; los biosurfactantes generados en procesos de biorremediación no son más que los surfactantes generados por las propias bacterias y tiene la función de mejorar la biodisponibilidad de sustancias hidrófobas de dos maneras distintas la primera con el aumento de rapidez en la que pueden diluirse algunas moléculas del hidrocarburo mediante su separación por las micelas y la otra por la influencia de la disolución que puede causar el surfactante en contacto con la superficie del compuesto, es por estas razones que ciertos microorganismos poseen y recurren a esta propiedad, ya que de este modo ayuda a aumentar la biodisponibilidad del sustrato a utilizar, por lo que beneficia al proceso de biorremediación, por la razón de que mientras un

contaminante se encuentra más biodisponible, más alto es el crecimiento de los microorganismos y por lo tanto más altas son las probabilidades de biorremediación (Riojas, Torres, Mondaca, Balderas, & Gortáres, 2013).

Durante la biodegradación de petróleo se ha observado que las diferentes fracciones de hidrocarburos se asimilan a tasas de consumo variadas, en respuesta a las diferentes afinidades que presentan las bacterias hacia los compuestos disponibles en el suelo, la cual dependerá de la estructura y del peso molecular. Por ejemplo (Das & Chandran, 2011) observaron que el orden de degradación fue: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > ciclo alcanos. Donde los alcanos lineales cuando son asimilados por las bacterias son metabolizados por la ruta de la β -oxidación produciendo alcohol como intermediario. Los alcanos lineales entre C₁₀ a C₂₄ son los primeros en consumirse debido a la baja hidrofobicidad que presentan. En otro estudio llevado a cabo con *Pseudomonas* se observó que consumió primero los alcanos entre C₅ y C₁₆ (Das & Chandran, 2011). Por otra parte se ha observado que entre más carbonos tenga la cadena lineal el compuesto es más hidrofóbico, volviéndolos no biodisponible a las bacterias, esto da como resultado que los alcanos de cadenas largas (>C₄₀) se degraden en un mayor lapso de tiempo, tal y como lo observaron (Mendelssohn, y otros, 2012), en estudios llevados a cabo en humedales del Golfo de México afectados por un derrame, se observó que en contaminantes monoaromáticos, se degradan por diferentes rutas metabólicas, dependiendo de la estructura molecular del compuesto. De los hidrocarburos que conforman el (Benceno, tolueno y xilenos), el tolueno es el de mayor consumo bajo condiciones aerobias, sin embargo dependiendo de las bacterias presentes en las zonas contaminadas, estas moléculas puede seguir diferentes rutas metabólicas. Resultados similares también se

han observado en la degradación de xilenos en presencia de *Pseudomonas* sp (Terry, Folwell, Mckew, & Sanni, 2012). En la degradación de los HAPs, se observa que la tasa de consumo se reduce conforme incrementan los anillos policíclicos aromáticos. Esto hace que se incrementa la hidrofobicidad y por ende no se encuentren disponibles para los microorganismos inmersos en el suelo. El proceso empieza con la oxidación de la molécula hidrocarburífera, con el fin de formar di hidrodioles, mismos que actuaran como intermediarios di hidroxilados orto o meta para formar catecol y así finalmente entrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Das & Chandran, 2011).

1.5.4. *Pseudomonas fluorescens*

Es un bacilo Gram negativo perteneciente al reino Bacteria, familia Pseudomonadaceae, clase Gamma proteobacteria, filo proteobacteria, orden pseudomonadales, género *Pseudomonas*, consta de bacilos curvos o rectos, y con flagelación polar, con medidas de 0,5 a 1 μm x 1,5 a 5,0 μm , la temperatura óptima para su metabolismo es de 25 a 30 °C, aunque puede crecer desde los 5 °C hasta los 42°C, no crece bajo condiciones ácidas (pH menor a 4,5) sino en condiciones de pH neutro; generalmente tiene un metabolismo sumamente versátil y se las puede encontrar en el suelo y en el agua. Tienen un metabolismo con requerimiento de oxígeno como aceptor final de electrones (aerobias), pero en otras ocasiones utilizan nitrato como aceptor final de electrones (anaerobia).

Pertenecen al grupo que realizan el ciclo de los ácidos tricarboxílicos con la finalidad de que puedan oxidar sustratos y dar como resultado una molécula de CO₂ y agua (Varela, 2011).

Dentro de estas bacterias se encuentran 3 diferentes vías de degradación de los hidratos de carbono: la vía glucolítica, la vía de Entner Doudoroff, la vía de pentosa fosfato,

pero para degradación de la glucosa las *Pseudomonas* utilizan la vía de Entner Doudoroff como acontece por las vías de las pentosas, donde se genera 1 molécula de ATP, por cada molécula de glucosa degradada (Varela, 2011).

Estas bacterias tienen la capacidad de fabricar biosurfactantes que intervienen en procesos de extracción de aceites y derivados, facilitando el ingreso de los hidrocarburos por pared celular para llevar a cabo los procesos metabólicos que conduzcan a la multiplicación celular a partir de los hidrocarburos como única fuente de energía y carbono, también poseen transposones, operones y plásmidos que aceleran la actividad degradativa y emulsificante (Shafy & Mansour, 2015). De igual manera se determinó que el consorcio bacteriano conformado por *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp. Y *Serratia rubidae* presentaran una alta actividad emulsificante y gran capacidad para degradar significativamente el crudo de petróleo alrededor de un 70-75 % (Escalante, 2002).

1.5.5. Rutas metabólicas de degradación de hidrocarburos por *Pseudomonas*

Algunas rutas metabólicas microbianas correspondientes a la degradación han sido ampliamente caracterizadas y están estrechamente relacionadas con plásmidos catabólicos encontrados en *Pseudomonas* (Torres D. , 2003). Debido a la presencia de genes contenidos en plásmidos, los cuales les confieren adaptabilidad catabólica y resistencia que otros microorganismos no son capaces de replicar y con ello poder degradar este compuesto.

La degradación de TPHs por *Pseudomonas*, empieza generalmente en todas con la oxidación del grupo metilo de n-alcanos por alcano hidroxilasa produciendo n-alcanoles que posteriormente son oxidados por alcohol deshidrogenasa unida a la membrana, los cuales son transformados a ácidos grasos y acetil-CoA por aldehído deshidrogenasa y acetil- CoA sintetaza respectivamente. Se ha reportado también una

ruta de degradación de n-alcanos donde se produce alcoholes secundarios en la cual los n alcanos son oxidados por monooxigenasas a alcoholes secundarios, después a cetonas y finalmente a ácidos grasos (Willey, Shewood, & Woolverton, 2012). (Ver anexo 5).

Los HAPs tales como naftaleno y fenantreno son degradados completamente en condiciones aeróbicas, la degradación de estos compuestos se inicia por dihidroxilación de uno de los anillos aromáticos polinucleares, seguido por la escisión del anillo dihidroxilado (Arrollo, 2000). (Ver anexo 6).

Las principales rutas metabólicas responsables de la degradación de HAPs en ambientes contaminados con hidrocarburos son: rutas alk (C_6 a C_{12} n-alcanos), nah (naftaleno), y xyl (tolueno). De donde *Pseudomonas fluorescens* ha sido considerada como la principal degradadora de naftaleno y fenantreno (Rockne, y otros, 2000).

Ruta alk

El compuesto más abundante encontrado en el crudo de petróleo son los n-alcanos los cuales pueden ser degradados aeróbicamente en diferentes rutas metabólicas. *Pseudomonas putida* es capaz de biodegradar n-alcanos de cadena media, debido a que posee el plásmido OCT capaz de codificar enzimas que participan en la degradación de los n-alcanos (Alanís & Guerrero, 1999).

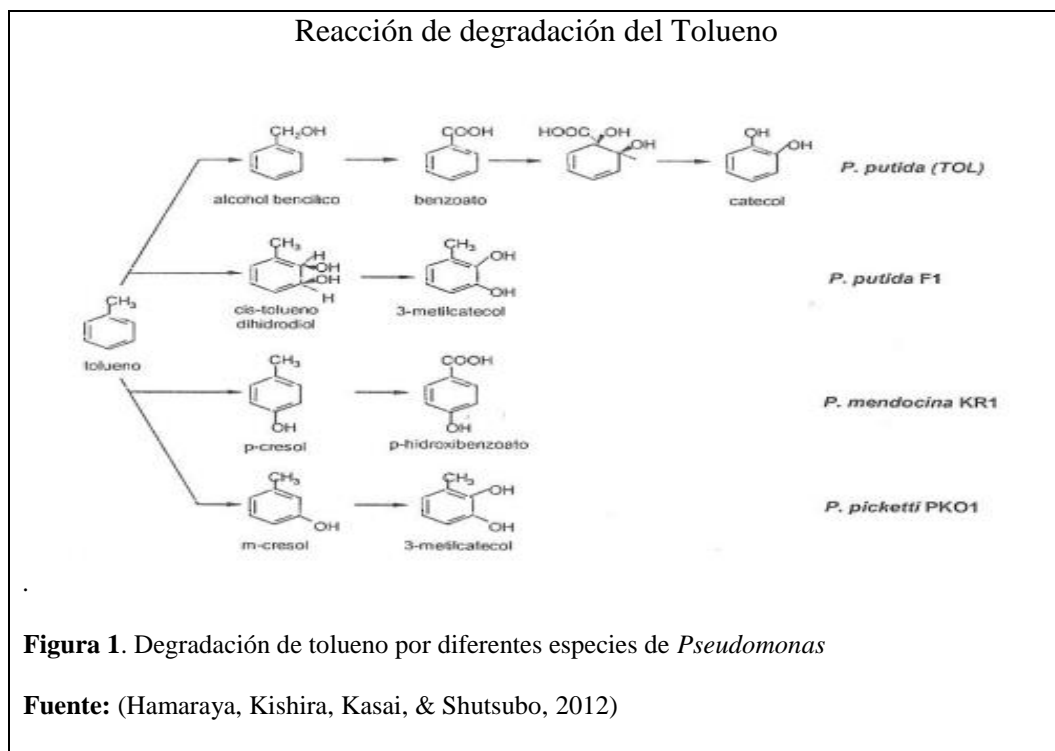
El primer paso de esta reacción es la producción de la alcano hidroxilasa, enzima que provoca la oxidación del grupo metilo de n-alcanos generando n-alcanoles que son oxidados por alcohol deshidrogenasa a n-alcanales los cuales subsecuentemente son convertidos a ácidos grasos y acetyl-CoA por aldehído deshidrogenasa y acetyl-CoA sintetasa (Hamaraya, Kishira, Kasai, & Shutsubo, 2012).

Ruta nah

Para la degradación de naftaleno se han establecido dos posibles rutas metabólicas empleadas por *P. putida*, en la primera ruta se puede dar la oxidación del anillo aromático adyacente al que contiene el metido, dando como resultado la formación de metil salicilato y metil catecol. Mientras que en la segunda ruta la cadena lateral del grupo metilo es hidroxilada a $-C_2-OH$ el cual es transformado a $-CHO$ y $COOH$ ocasionando que se forme el ácido nafaótico como producto final (Arrollo, 2000).

Ruta xly

En la degradación de compuestos aromáticos como el tolueno, es necesario la presencia del plásmido TOL (Plásmido que codifica la ruta para la degradación de toluenos y xilenos). Dependiendo de la especie de *Pseudomonas* que esté realizando la biodegradación, el producto final obtenido puede variar (figura 1), ya que existen diferentes rutas metabólicas que el tolueno puede adoptar. Por ejemplo Hamaraya, Kishira, Kasai, & Shutsubo, (1999) mencionan que el tolueno puede ser transformado o degradado sucesivamente a alcohol bencílico, benzoato y catecol gracias a la participación de *P. putida* (TOL) (Hamaraya, Kishira, Kasai, & Shutsubo, 2012).



1.6. Fundamento legal

Dentro del reglamento propuesto en el RAHOE 1215 año 2012 (reglamento ambiental de actividades hidrocarburífera) y el TULAS (texto unificado de legislación ambiental secundaria), libro VI del Anexo 2 propone:

Según el (RAHOE) (2012):

CAPÍTULO XII: límites permisibles

Art. 86.- Parámetros.- Los sujetos de control y sus operadoras y afines en la ejecución de sus operaciones, para descargas líquidas, emisiones a la atmósfera y disposición de los desechos sólidos en el ambiente, cumplirán con los límites permisibles que constan en los Anexos No. 1, 2 y 3 de este Reglamento, los cuales constituyen el programa mínimo para el monitoreo ambiental interno y se reportarán a la Subsecretaría de Protección Ambiental conforme la periodicidad establecida en el artículo 12 de este Reglamento.

Los límites permisibles a aplicarse en un proyecto determinado dependen del uso posterior a darse al suelo remediado, el cual constará en el respectivo Programa o Proyecto de Remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental. De presentar los suelos naturales (no contaminados) del área concentraciones superiores a los límites establecidos, se pueden incrementar los valores del respectivo parámetro hasta este nivel, siempre que se haya comprobado este fenómeno estadísticamente a través de un monitoreo de suelos no perturbados ni influenciados en la misma área.

Tratamientos Biológicos:

***Literal 4.1.3.7** Independiente del tratamiento que el regulado adopte, los suelos contaminados deberán alcanzar los niveles de concentración establecidos en los criterios de remediación de suelos establecidos (tabla 2) en la presente Norma. Los valores serán aplicados de acuerdo al uso de suelo donde se sitúa el área contaminada.*

Literal 4.2.2 Criterios de Remediación o Restauración del Suelo.

Los criterios de Remediación o Restauración se establecen de acuerdo al uso que del suelo (agrícola, comercial, residencial e industrial), y son presentados en la Tabla 3. Tienen el propósito de establecer los niveles máximos de concentración de contaminantes de un suelo en proceso de remediación o restauración (Tulas, 2012).

Tabla 1.

Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria Hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicio.

Parámetro	Expresado en:	Unidad	Uso Agrícola	Uso Industrial	Ecosistemas sensibles
Hidrocarburos totales de petróleo	TPH	mg/kg	<2500	<4000	<1000
HAP	C	mg/kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/kg	<2	<10	<1
Níquel	Ni	mg/kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/kg	<100	<500	<80

Fuente:(Ministerio de Hidrocarburos , 2010)

Tabla 2.

Criterios de remediación o restauración de suelos.

HIDROCARBUROS	UNIDADES (CONCENTRACIÓN EN PESO Seco)	USO DEL SUELO			
		AGRICOLA	RESIDENCIAL	COMERCIAL	INDUSTRIAL
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS					
Benceno	mg/kg	0,05	0,5	5	5
Etilbenceno	mg/kg	0,1	1,2	20	20
Estireno	mg/kg	0,1	5	50	50
Tolueno	mg/kg	0,1	0,8	0,8	0,8
Xileno	mg/kg	0,1	1	17	20
Compuestos Aromáticos	mg/kg	-	-	-	-
Clorofenoles	mg/kg	0,05	0,5	5	5
Fenoles (total)	mg/kg	3,8	3,8	3,8	3,8
HAPs	mg/kg	-	<2	<5	<1
Benzo(a)antra	mg/kg	0,1	1	1	1
Benzo(a)pirenos	mg/kg	0,1	0,7	0,7	0,7
Naftaleno	mg/kg	0,1	0,6	22	22
Pirenos	mg/kg	0,1	10	10	10

Fuente: Ministerio de Hidrocarburos,(2010)

Capítulo 2

Metodologías

La presente investigación se desarrolló en dos fases: campo y laboratorio. La primera fase se llevó a cabo en el sector “El Coca” en la Provincia de Orellana, ciudad Francisco de Orellana para la obtención de las muestras de suelo. La fase experimental se realizó en tres laboratorios: Gruntec Environmental Services, en el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) sede Girón y en el Laboratorio de Análisis de suelos de la UPS “Centro de apoyo Cayambe”.

2.1. Fase de Campo

Georreferenciación de los sitios de muestreo

Ubicación: El Coca

Provincia: Orellana

Temperatura: 22°- 40° C.

Precipitación: 1057 m.s.n.m.



Nota: Georreferenciación del lugar de muestreo

Fuente: Google Earth, 2017

Elaborado por: El autor, 2018.

2.2. Muestreo de suelo

2.2.1. Muestreo de suelo para análisis físicos químicos.

Las muestras de suelo contaminado se recolectaron mediante la técnica tres bolillos, se realizó una excavación (15-20 cm de profundidad), se tomaron 12 submuestras en varios puntos de 2 kg, mismas que fueron colocadas en un saquillo de polietileno de 0,8 μ mm de diámetro del poro. Se mezcló uniformemente para tomar tres muestras compuestas de 1 kg, que se colocaron en fundas ziploc etiquetadas (lugar, fecha, tipo de muestra, responsable y número de muestra).

Las muestras fueron transportadas hasta los laboratorios y distribuidas de la siguiente manera: una muestra al laboratorio de Análisis de Suelo de la Universidad Politécnica Salesiana “Centro de apoyo Cayambe” para los análisis fisicoquímicos; otra muestra al laboratorios de Ciencias de la Vida UPS sede Quito, la última muestra se trasladó hacia el laboratorio de Gruntec Environmental Services para los respectivos análisis cualitativos y cuantitativos de TPHs y HAPs, donde se analizaron TPHs por el método EPA 8015 y HAPs por el método 8270.

2.2.2. Obtención de *Pseudomonas fluorescens*

La cepa certificada se obtuvo del Laboratorio Diserlab perteneciente a la Pontificia Universidad Católica de Quito.

2.3. Fase del laboratorio

2.3.1. Preparación de medios de cultivo empleados

Se utilizaron 3 tipos de agar: TSA (Trypticase Soy Agar), TSB (Trypticase Soy Broth) y Cetrimida Agar para bacterias. Se prepararon en función de las etiquetas de la casa productora de cada medio (ver anexo 7).

2.3.2. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens*

2.3.2.1. Diluciones Seriadas

Para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens*, se empleó la técnica de dilución seriada misma que se utilizó para cuantificar los microorganismos en una placa de cultivo. Se realizaron diluciones seriadas en base 10, donde se tomó 10 g de suelo y se colocaron en 90 mL de agua estéril con 1 g cloruro de sodio siendo esta la solución madre. En el tubo 1 que contenía 9 mL de agua se colocó 10 μ L de la solución madre obteniéndose la dilución 10^{-1} , a partir de este tubo se tomó 10 μ L y se colocó en el tubo de la dilución 10^{-2} , este procedimiento se realizó hasta la dilución 10^{-6} .

Con una micropipeta se tomó 0,1 mL de cada dilución y se sembró en cajas Petri utilizando el método de siembra en superficie. Cada dilución se sembró por triplicado, posteriormente se llevaron a incubar durante 1 día a 35 °C.

2.3.3. Purificación

La purificación de *Pseudomonas* se llevó a cabo usando solventes orgánicos (fenol), donde se partió de 50mL de caldo de *Pseudomonas*, mismo fue centrifugado a 8000 rpm durante 30 min. El Pelet formado de células fue concentrado 10 veces y se ajustó el pH a 5 con ácido clorhídrico 1 M. Se procedió a la extracción con acetato de etilo Bello y otros (2006).

2.3.4. Identificación macroscópica

Consistió en la observación del haz y el envés de la caja Petri con la finalidad de determinar las características macroscópicas de la colonia como el color, forma y crecimiento (rápido crecimiento, color verde, superficie, presencia de agregados secos y exudados hialinos).

2.3.5. Identificación microscópica

Se basó en el método de tinción Gram, donde se realizó un frotis con agua destilada del cultivo y se fijó con calor, el frotis fijado se lo tiñó con Violeta de genciana durante 1 minuto, se lavó con agua, se cubrió con solución Yodada durante 1 minuto y se lavó nuevamente con agua, se decoloró con una mezcla etanol-acetona, se escurrió y cubrió con safranina durante 1 minuto. Finalmente se hizo el lavado con agua y se dejó secar cerca del mechero. Posterior las placas fueron observadas en el microscopio óptico con el lente de 100X con aceite de inmersión, donde se visualizó la forma de las bacterias y presencia o ausencia de filamentos.

2.3.6. Identificación de *Pseudomonas fluorescens* por pruebas bioquímicas

Para corroborar el género se tomó con una asa una porción de la colonia bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* de la caja Petri, la cual se sembró por inoculación directa en el tubo que contenía Agar TSI, aquí se realizó la reacción bioquímica de identificación, sembrando *P. fluorescens* en la parte superior del tubo (Porción de medio donde se fermenta la lactosa y la sacarosa) y parte inferior del mismo donde se fermenta la glucosa, se incubó durante 72 horas a 35°C y se siguió la lectura e interpretación del código Kalium-kalium K/K donde se pudo evidenciar que el tubo de reacción se tiñó de color rojo (Córdoba Pizarro, 2009).

2.3.7. Resiembras

En la cámara de flujo laminar se tomaron muestras de *Pseudomonas* de las cajas petri con masivo crecimiento bacteriano y se inoculó estas bacterias en el centro de nuevas cajas Petri con medio de cultivo TSA. Posteriormente fueron incubadas a 35 °C por 1 día en ausencia de luz.

2.3.8. Conservación de *Pseudomonas fluorescens*

Se tomó con el asa microbiológica varias colonias de una caja Petri y se dispersaron en el medio que contiene el tubo de CRYOBANK, se agito por 3 minutos con el objetivo que la bacteria se adhiriera a las perlas, finalmente se removió el medio de cultivo del tubo con una micropipeta estéril y se congeló a una temperatura de -80°C.

2.3.9. Inoculación de *Pseudomonas fluorescens* al suelo contaminado

A. Montaje de las unidades experimentales

- **Preparación de cajas:** Las 12 cajas con dimensiones de 30 cm de ancho x 10 cm de alto x 18,5 cm de profundidad, se forraron internamente con plástico negro (tipo invernadero) y en la parte inferior se hicieron 5 huecos para el respectivo drenaje. Se codificó a cada una de las cajas de acuerdo a su respectivo tratamiento.
- **Preparación del suelo:** Del suelo obtenido en campo se escogieron y se separaron las hojas secas, piedras, ramas, tubérculos, etc. Luego se pesó 1,5 kg de suelo y se colocó en cada unidad experimental.

B. Tratamientos del experimento

Tabla 3.

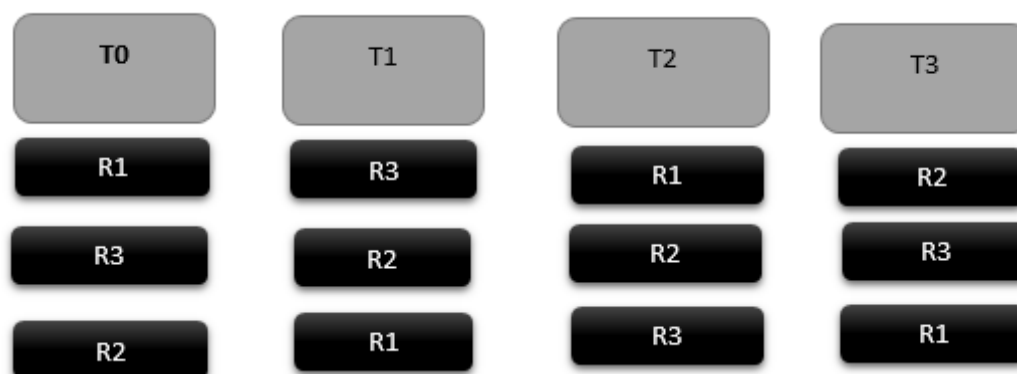
Tratamientos aplicados en la unidad de experimentación durante la investigación

Nº Tratamiento	Tipo de tratamiento
T ₀	Suelo + Hidrocarburo+ 150mL de agua
T ₁	Suelo + hidrocarburo + 150mL de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 10 ⁴ UFC/mL
T ₂	suelo + hidrocarburo + 150mL de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 10 ⁶ UFC/mL
T ₃	suelo con hidrocarburo + 150mL de <i>Pseudomonas fluorescens</i> 10 ⁸ UFC/mL

Elaborado por: El autor, 2018.

C. Diseño experimental

Se dispuso las 12 unidades experimentales en un DBCA (diseño de bloques completos al azar) con tres repeticiones que tuvieron condiciones ambientales homogéneas.



Elaborado por: El autor, 2018.

Para la inoculación de *Pseudomonas fluorescens* en las unidades experimentales se realizaron tres pasos que consistieron en: preparación del inóculo y espectrofotometría, cuantificación de células por cámara Neubauer e inoculación de la solución.

2.3.9.1. Preparación del inóculo y espectrofotometría

Con un asa se realizó un raspado superficial de todo el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* de 10 cajas Petri, las cuales fueron traspasadas a tubos de 50mL falcon que contenían 45 mL de medio TSB, los cuales se dejaron incubar por 24 horas hasta su centrifugación (3000 rpm). El pelet formado fue suspendido en agua destilada estéril mediante agitación en un vortex por 30 segundos, para finalmente traspasar el contenido a un frasco de vidrio Boeco de 1L y realizar la espectrofotometría respectiva para cada concentración de bacteria, con un espectro de 655,0 nm y 0,408 A.

2.3.9.2. Cuantificación de células por cámara Neubauer

Se colocó 1 mL del cultivo de la solución preparada en un tubo de ensayo y se agregó 1 gota de azul de metileno, se mezcló y se dejó reposar durante 7 minutos, posterior a esto se depositó una gota del inóculo entre la cámara y el cubreobjetos, se dejó reposar durante 10 minutos y se colocó la cámara en el microscopio de 40 X para proceder a la cuantificación de células (Aquiahuatl, y otros, 2012). Esto se determinó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración en células/mL} = n \times 25 \times 50 \times 1000$$

Donde **n** = número de células contadas en las 16 celdas.

2.3.9.3. Inoculación al suelo

Se aplicaron 150 mL del inóculo con *P. fluorescens* con un aspersor a cada caja con el respectivo tratamiento; con una espátula se mezcló hasta homogenizar el suelo. La inoculación se realizó dos veces por semana.

2.4. Variables del experimento

Las variables evaluadas en el experimento fueron: conductividad eléctrica, pH temperatura, humedad y concentración de HAPs y TPHs.

2.4.1. pH y Conductividad eléctrica

Se pesó 5 g de suelo y se agregó 10 mL de agua destilada, se agitó la solución durante 10 min y se dejó que repose durante 5 minutos. Se introdujo los electrodos para pH y conductividad eléctrica en dS/m y se tomó los datos respectivos todos los días durante la fase experimental. El pH-metro fue calibrado con soluciones estabilizadoras (buffer) de pH conocido (4,0-7,0-10,0) respectivamente.

2.4.2. Temperatura y Humedad

Se utilizó un termohigrómetro el cual se introdujo en el centro de cada una de las unidades experimentales para que la sonda de medición inmersa en el suelo proyecte los valores respectivos de temperatura en grados centígrados (°C) y humedad en porcentaje (%), todos los días durante la fase experimental.

2.4.3. Análisis Físico Químicos

Los análisis físicos y químicos se realizaron en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Politécnica Salesiana Centro de apoyo Cayambe, mismos que se realizaron al inicio y al final del experimento (ver anexo 13). Los parámetros físicos químicos analizados fueron: contenido de materia orgánica, P, K, Ca, Mg asimilable, Fe, Mn, Cu, Zn, Sodio intercambiable, B y S extractable, pH, conductividad eléctrica, y clase textural, basados en procedimientos estandarizados internacionales.

Tabla 4.

Parámetros analizados y su metodología.

Parámetro	Método de Valoración	Unidades de Medición
Materia Orgánica	Método KJELDAHL (ver anexo 8).	%
P-Fe-Mn-Cu-Zn Asimilable	Olsen Modificado (ver anexo 9).	Ppm
K - Ca -Mg Asimilable	Cationes de cambio (ver anexo 10).	meq/100 g
Ca-Mg-K-Na intercambiable	Cationes de cambio (ver anexo 10)	meq/100 g

Elaborado por: El autor, 2018.

2.4.4. Concentración de HAPs y TPHs

Los análisis cualitativos y cuantitativos de los TPHs y HAPs se realizaron en Gruntec Environmental Services al inicio y al final de la investigación donde se analizó TPHs por el método EPA 8015 y HAPs por el método EPA 8270 (ver anexo 11).



Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Caracterización macro y microscópica de la carga microbiana del suelo contaminado

Tabla 5.

Caracterización macroscópica de la carga microbiana del suelo contaminado

Caracterización macroscópica en laboratorio	Caracterización fuentes bibliográficas
 <p>Caracterización de <i>Trichoderma</i> sp en medio PDA a 35°C. Elaborado por M. Pérez, 2018.</p>	 <p>Nota: Tomado de (Guigón López, y otros, 2010)</p>


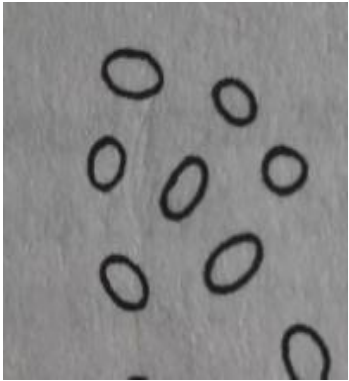
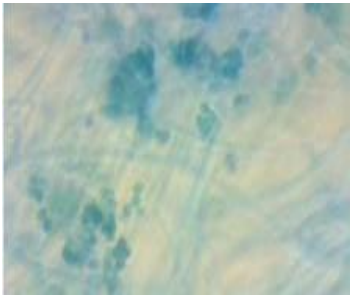
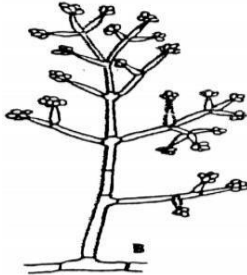

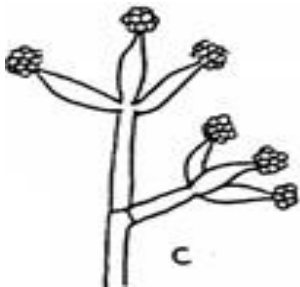
Elaborado por: El autor, 2018.

La tabla 5, indica las características macroscópicas de *Trichoderma* sp, donde las figuras de la columna izquierda son las obtenidas en el laboratorio y muestran la formación del micelio, alcanzando el límite de la caja Petri con un diámetro de 10,0 cm y 1,10 mm de altura, muestra una coloración verde amarillenta y de aspecto

arrugado, el envés de la placa muestra una coloración amarillenta con surcos arrugados. La característica típica de este hongo es que en los primeros días presenta una coloración entre blanco y amarillo pálido, el cual cambia de color en el quinto y séptimo día a una coloración amarilla verdosa típica del hongo. Al comparar con las imágenes de la columna derecha se puede evidenciar que presenta características morfológicas similares donde se observa el crecimiento de *Trichoderma* sp. Según Guigón, y otros(2010) que mencionan características principales como: crecimiento rápido de las colonias, esporulación abundante con pústulas verdes, micelio aéreo blanco o ligeramente amarillo, conidiación que cubre toda la superficie de la placa que produce pústulas planadas hasta de 10 mm de diámetro y con frecuencia rodeado por micelio blanco. Al reverso de la placa menciona colonias blancas amarillentas. Descripción que concuerda con lo observado en laboratorio y se comprueba que el género corresponde al hongo *Trichoderma* sp.

Tabla 6.

Caracterización microscópica de *Trichoderma* sp.

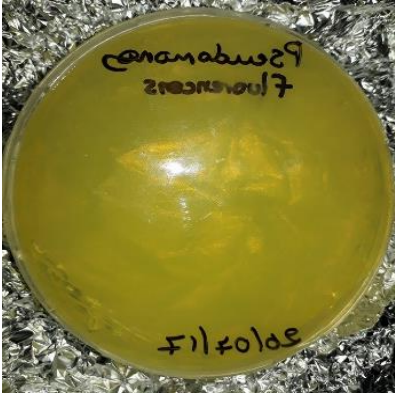



Caracterización microscópica en laboratorio	Caracterización fuentes bibliográficas
 <p>Conidios Elaborado por M. Pérez, 2018.</p>	 <p>Conidios Nota: Tomado de (Barnett, 1967)</p>
 <p>Conidióforos con ramificación. Elaborado por M. Pérez, 2018.</p>	 <p>Conidióforos con ramificación Nota: Tomado de (Barnett, 1967)</p>
 <p>Producción de conidios Elaborado por M. Pérez, 2018.</p>	 <p>Producción de conidios Nota: Tomado de (Barnett, 1967)</p>

Elaborado por: El autor, 2018.

La tabla 6, indica las características microscópicas de *Trichoderma* sp, donde las figuras de la columna del lado izquierdo son las obtenidas en el laboratorio y muestran características como: hifas delgadas septadas, conidióforos hialinos largos y ramificados a manera de árbol, fiálides alargadas con la producción de conidios en forma ovoide en los segmentos terminales de color verde, estas características comparadas con las figuras del lado derecho correspondientes a la guía de (Barnett, 1967) donde menciona “*Trichoderma* sp presenta hifas septadas, conidióforos hialinos, ramificado, no verticiladas; fiálides individuales o en grupos, conidios ovoides de color verde pálido. Corroborando que las imágenes presentadas por el autor coinciden con las características morfológicas similares de *Trichoderma* sp.

Tabla 7.

Características macroscópicas de *Pseudomonas fluorescens*

Caracterización macroscópica en laboratorio	Caracterización fuentes bibliográficas
 <p>Caracterización macroscópica de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en medio TSA Elaborado por M. Pérez, 2018.</p>	 <p><i>Pseudomonas fluorescens</i> (Castillo Vera, 2013)</p>
 <p>Caracterización macroscópica de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en medio TSA a 35°C. Elaborado por M. Pérez, 2018.</p>	 <p>Caracterización macroscópica de <i>Pseudomonas fluorescens</i>. (Castillo Vera, 2013)</p>


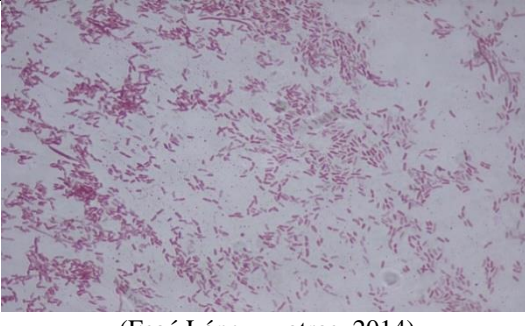
Elaborado por: El autor, 2018.

La tabla 7, indica las características macroscópicas de *Pseudomonas fluorescens*, donde las figuras de la columna del lado izquierdo son las obtenidas en el laboratorio y muestran los primeros días de crecimiento, su coloración amarillo verdoso típica de

esta especie y morfología colonial. Al comparar con las figuras de la columna del lado derecho correspondiente a Castillo (2013); (Castillo Vera, 2013) que menciona *que P. fluorescens* tiene una morfología colonial Se puede corroborar que las imágenes presentadas por el autor coinciden con las características morfológicas son similares de *P. fluorescens*.

Tabla 8.

Caracterización microscópica de *Pseudomonas fluorescens* por el método de Tinción Gram

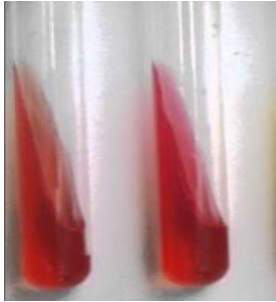

Identificación por Tinción Gram	Identificación por bibliografía
 <p>Elaborado por M. Pérez, 2018.</p>	 <p>(Esaú López, y otros, 2014).</p>

Elaborado por: El autor, 2018.

La tabla 8, muestra las características por la técnica de Tinción Gram para *Pseudomonas fluorescens* donde la figura de la columna del lado izquierdo es la obtenida en el laboratorio y muestra la formación de bacilos cortos agrupados y asilados y sin formación de esporas, mientras que la figura del lado derecho muestra las características de las bacterias Gram negativas correspondiente a (Esaú López, y otros, 2014) que mencionan que *P. fluorescens* presenta una formación de bacilos cortos agrupados sin formación de esporas, corroborando de esta manera que sus características morfológicas son similares.

Tabla 9.

Identificación de *Pseudomonas fluorescens* por pruebas Bioquímicas

Identificación por Pruebas Bioquímicas	Identificación por bibliografía
 <p>Caracterización de <i>Pseudomonas fluorescens</i> por pruebas Bioquímicas. Elaborado por M. Pérez, 2018.</p>	 <p>(Rondinone & Giovanniello, 2000)</p>

Elaborado por: El autor, 2018.

La tabla 9, muestra la identificación de *Pseudomonas fluorescens* mediante las pruebas bioquímicas donde la figura de la columna del lado izquierdo es la obtenida en el laboratorio y muestra las características tintoriales de la oxidación de la glucosa, mientras que la figura de la columna del lado derecho muestra las características tintoriales analizadas por pruebas bioquímicas según Rondinone & Giovanniello (2000) que mencionan que cuando se realiza siembras por inoculación directa a partir de la cepa obtenida y se logra evidenciar una coloración completamente roja se puede confirmar que esta reacción es propia de *Pseudomonas* debido a que no existe fermentación de glucosa y la característica principal de *Pseudomonases* oxidar carbohidratos pero no fermentarlos. Corroborando que las imágenes presentadas por el autor coinciden con las características presentadas por Rondinone & Giovanniello(2000).

3.2. Análisis de las variables

3.2.1. Potencial de hidrógeno (pH)

Tabla 10.

Análisis de la Varianza para la variable pH y Tukey al 5 %.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Significancia * *		
CV= 0,21 %						Tukey (5 %)		
Datos	SC	G L	CM	F	P- valo r	Tratamientos	Medi a	Rango
Error	0,0018	6	0,0003			T0	8,92	D
Repeticiones	0,0006	2	0,0003	1,00	0,4219	T1	8,00	C
Tratamientos	2,55	3	0,85	282 8,33	<0,001	T2	7,86	B
Total	2,55	11				T3	7,77	A

Nota: T0 (Suelo + Hidrocarburo), T1 (Suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁴ UFC/mL”), T2 (suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁶ UFC/mL”) y T3 (suelo con hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁸ UFC/mL”).

Fuente: (InfoStat, 2015)

Elaborado por: El autor, 2018.

En la Tabla 10, se indica el valor de la media de los tratamientos para la variable pH, donde el T0 presenta el mayor pH del proceso con 8,92 seguido de T1 con 8,00; T2 con 7,86 y finalmente T3 con 7,77.

El C.V. es 0,21%, lo cual indica una mayor confiabilidad en los valores de la variable pH y corrobora que los datos obtenidos durante la investigación son confiables, debido a que los valores obtenidos al final de la investigación se encuentran dentro del rango permisible para este tipo de ensayos.

La prueba de Tukey al 5%, presenta cuatro rangos de significancia categorizados como “A” para el T3 con 7,77; “B” para T2 con 7,86; “C” para el T1 con 8,00 y finalmente “D” para el T0 con 8,92 es decir, todos los tratamientos son estadísticamente diferentes y significativos.

La variación del pH se debe a la acción de las bacterias sobre el hidrocarburo donde esta reducción se debe posiblemente a la acción del metabolismo de *Pseudomonas fluorescens* sobre el hidrocarburo, debido a que estas bacterias pueden haber modificado el pH del suelo reduciéndolo con la finalidad de mejorar la actividad enzimática bacteriana tanto de peroxidasas y oxigenasas que permitirán la oxidación de fracciones tóxicas del hidrocarburo, en condiciones básicas logrando así una mayor eficacia en el proceso de biorremediación y generando procesos de liberación de compuestos como alcanos de cadena larga y ácidos grasos. Además la disminución del pH también se vio afectado por la hidrólisis generada en el proceso metabólico, la cual implica una liberación de iones H^+ provocada por el proceso de degradación de moléculas orgánicas como el naftaleno y fenantreno (transformados a ácido salicílico conjuntamente). Según Akpan, Kingsley y Nwadinigwe (2013) afirman que la reducción del pH en suelos contaminados con hidrocarburos es provocada por el proceso de degradación de moléculas orgánicas (naftaleno y fenantreno) propias del hidrocarburo por parte de la bacteria, debido a la emancipación de ácidos grasos y ruptura de cadenas alifáticas presentes en los hidrocarburos, provocando así que sea una fuente orgánica asimilable para la bacteria.

El tratamiento que indica una mayor variación de pH es el T3, sin embargo, T2 y T1 presentaron pH inferiores comparados con el T0 (suelo con hidrocarburo) debido a que en estos tratamientos se inoculó las distintas concentraciones bacterianas a excepción de T0, demostrando que las concentraciones utilizadas en el ensayo si tiene influencia en el proceso de biodegradación logrando alcanzar al final del ensayo un pH alcalino cercano a la neutralidad. El T0 al final del ensayo mostró una reducción de pH y pasó a ser básico y levemente más elevado que el pH obtenido en los distintos tratamientos inoculados debido a que existió *Trichoderma* sp identificado entre uno de los de microorganismos

autóctonos con capacidad degradativa que lograron degradar contaminantes del hidrocarburo. La reducción del pH en cada uno de los tratamientos incluyendo al T0 controló la eficacia de las reacciones químicas entre la bacteria y el sustrato para que los nutrientes sean disponibles (solubles) para poder ser asimilados por la bacteria en el proceso de degradación de hidrocarburos. Según Ferrera, Rojas, Poggi, Alarcón y Cañizares (2013) mencionan que el rango del pH en el cual las bacterias como las *Pseudomonas* crecen óptimamente favoreciendo sus procesos enzimáticos para la biorremediación están entre 6,00 a 8,00, demostrando así que el pH de los tratamientos inoculados favoreció al proceso de biorremediación.

Según He, Duan, & Liu (2014) mencionan que durante el proceso de biorremediación las bacterias pueden modificar el pH del suelo productos del metabolismo y generar procesos oxidativos que alteran las propiedades de los compuestos del hidrocarburo haciéndolos susceptibles a ataques secundarios y facilitando su transformación a dióxido de carbono y agua, generando así un proceso de liberación de compuestos (alcanos de cadena larga y ácidos grasos).

Según Acuña, Pucci y Pucci (2013) mencionan que el proceso de degradación se realiza debido a que las *Pseudomonas* son bacterias productoras de biosurfactantes como los ramnolipidos, compuestos que solubilizan nutrientes para ser asimilados y favorecen a la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrofílica, alterando de tal forma la composición del medio (pH).

3.2.2. Conductividad eléctrica (C.E).

Tabla 11.

Análisis de varianza para la variable C.E. y Tukey al 5 %.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Significancia * *		
CV= 0,56 %						Tukey (5 %)		
Datos	SC	G L	CM	F	P- valor	Tratamientos	Media	Rango
Error	0,01	6	0,0009			T0	6,77	C
Repeticiones	0,01	2	0,0026	2,91	0,1310	T1	5,01	B
Tratamientos	9,04	3	3,01	3358,72	<0,001	T2	5,00	B
Total	9,05	11				T3	4,47	A

Nota: T0 (Suelo + Hidrocarburo), T1 (Suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁴ UFC/mL”), T2 (suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁶ UFC/mL”) y T3 (suelo con hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁸ UFC/mL”).

Fuente: (InfoStat, 2015)

Elaborado por: El autor, 2018.

En la Tabla 11, se indica el valor de la media de los tratamientos para la variable C.E., donde el T0 indica la mayor C.E de los tratamientos analizados con 6,77 dS/m, seguido de T1 con 5,01 dS/m; T2 con 5,00 dS/m y finalmente T3 con 4,47 dS/m.

El C.V. es 0,56%. La prueba de Tukey al 5%, indica tres rangos de significancia categorizados como “A” para el T3; “B” para T2 y T1, esto indica que en estos tratamientos los valores fueron similares y oscilaron entre 5,00 dS/m y 5,01 dS/m. y finalmente “C” para el T0, es decir todos los tratamientos a excepción del T1 y T2 son estadísticamente diferentes y significativos.

Al comparar la C.E de un suelo sin contaminar con 0,20 dS/m, con un suelo contaminado, se observa que este aumentó a 6,91 dS/m, debido a que el hidrocarburo conlleva en su estructura una amplia gama de compuestos salinos (una porción disuelta en el agua y otra

porción en forma de cristales muy finos), mismos que alteran la composición del suelo aumentando la C.E. Por otra parte la reducción de la C.E en un suelo sometido al proceso de biorremediación se puede deber a la acción de la bacteria, debido a que utiliza el dibenzotiofeno (DBT) presente en el hidrocarburo como única fuente de azufre, y además transforma los hidrocarburos nitrogenados en bases orgánicas y amoníaco para su proceso metabólico, los cuales son utilizados como aceptores de electrones (azufre o nitrato), siendo estos indispensables para el metabolismo bacteriano.

A pesar de esto, el tratamiento que indica una mayor variación de la C.E. es el T3, sin embargo, T2 y T1 presentaron valores de C.E. inferiores comparados con el T0 (suelo con hidrocarburo) donde posiblemente ocurrió un proceso de intercambio catiónico entre la solución del suelo y el hidrocarburo con la finalidad de mineralizar nutrientes y poder ser asimilados por la bacteria utilizando sales como N, P y S en el proceso metabólico de degradación de hidrocarburos. De esta manera se demuestra que las concentraciones utilizadas en el ensayo si tiene influencia en el proceso de biodegradación de hidrocarburos, debido a la disminución de la C.E al final del ensayo. El T0 mantuvo una C.E. elevada comparada con los distintos tratamientos inoculados, esto afirma que a mayor CE, mayor es la concentración de sales, es decir en T0 no existió una mineralización adecuada.

Nápoles, Marañón, Cumba, Anllo, & Ábalos (2012) mencionan que la conductividad eléctrica se ve aumentada debido a la presencia de aditivos utilizados para procesos productivos tales como para obtención de diésel o gasóleo, provocando así que los hidrocarburos imposibiliten la solubilización de las sales e iones existentes en el suelo y de esta manera superar los valores de C.E. normales del suelo.

Oropeza, (2010) menciona que al relacionar valores de pH y C.E se puede evidenciar que los hidrocarburos poseen una extrema salinidad y además contiene hidrocarburos

nitrogenados en forma básica como quinileína, isoquinoleína y piridina, hidrocarburos neutros como pirrol, indol y carbazol, lo que se traduce en un aumento de la conductividad eléctrica del suelo en el que se encuentren.

El suelo es considerado como un medio receptivo por excelencia, puesto que interacciona químicamente con diferentes factores bióticos y abióticos, ocasionando que este adquiera una capacidad limitada de autodepuración, traducéndose en la asimilación de una cierta cantidad de contaminantes y nutrientes por parte de los microorganismos para su depuración. En este ensayo se ha potenciado la capacidad de depuración del suelo por medio del aumento de la actividad microbiana, lo que en efecto se refleja con la disminución progresiva de la C.E, aproximándose al valor de referencia establecido por el TULAS, (2012), cuyos valores para tratamiento biológico de restauración de suelos contaminados no deben ser superiores a 4,00 dS/m en lo que respecta a conductividad eléctrica.

3.2.3. Temperatura

Tabla 12.

Análisis de varianza para la variable temperatura y Tukey al 5 %.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Significancia *		
CV= 3,6 %						Tukey (5 %)		
Datos	SC	G L	CM	F	P-valor	Tratamientos	Media	Rango
Error	0,49	6	0,08			T0	19,74	A
Repeticiones	0,14	2	0,07	0,83	0,4791	T1	19,65	A
Tratamientos	0,04	3	0,01	0,15	0,9285	T2	19,78	A
Total	0,66	11				T3	19,78	A

Nota: T0 (Suelo + Hidrocarburo), T1 (Suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁴ UFC/mL”), T2 (suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁶ UFC/mL”) y T3 (suelo con hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁸ UFC/mL”).

Fuente: (InfoStat, 2015)

Elaborado por: El autor, 2018.

En la Tabla 12, se indica el valor de la media de los tratamientos para la variable temperatura. Donde el T3 y T2 presenta la mayor temperatura del proceso con 19,78°C; seguido de T0 con 19,70°C y finalmente T1 con 19,65°C.

El C.V. es 3,6%, La prueba de Tukey al 5%, indica un solo rango de significancia y categorizado como “A” para el T0, T1, T2, y T3, esto indica que en estos tratamientos los valores fueron similares y oscilaron entre 19,65 °C y 19,78°C. Es decir que estadísticamente son iguales, debido a que todos los tratamientos empleados en la investigación se encontraron con las mismas condiciones ambientales.

La temperatura es importante en la degradación del hidrocarburo debido a que acelera o disminuye el metabolismo y velocidad de reacción de los procesos metabólicos, favoreciendo o no al intercambio gaseoso con la atmósfera y condicionando al

crecimiento y la supervivencia de las bacterias, donde dependiendo del tipo de hidrocarburo y a la temperatura que estén expuestos afecta directamente a la actividad metabólica de los mismos, aumentando de tal forma la fluidez de la membrana y acelerando procesos de transporte de nutrientes, promoviendo así a la activación de proteínas enzimáticas en su máxima expresión.

Pseudomonas fluorescens crecen a temperaturas entre 18 y 40°C (condiciones mesófilas) y corrobora que de acuerdo a los datos obtenidos, a pesar de no estar dentro del rango de crecimiento óptimo (37 °C), las bacterias lograron realizar su proceso metabólico pero en mayor tiempo, demostrando de tal manera que la temperatura influye directamente en el proceso de biorremediación de hidrocarburos mejorando su actividad metabólica y la velocidad de crecimiento bacteriano.

Según Ñustez (2012) menciona que cuando se supera los 45°C se produce una reducción del metabolismo bacteriano, debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas de las bacterias. Por otro lado, cuando la bacteria se encuentra en bajas temperaturas donde la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de alcanos de cadena corta se reduce disminuyendo así la solubilidad del O₂ en agua, afectando a la biodegradación y generando colapsamiento de la membrana citoplásmica y lisis térmica de la bacteria.

Acuña y otros (2013) mencionan que a temperaturas inferiores a 10°C, la degradación se ve perjudicada, disminuyendo la velocidad de reacción, modificando su solubilidad y reduciendo la volatilización de partes tóxicas que alterarían la actividad metabólica.

3.2.4. Humedad

Tabla 13.

Análisis de varianza para la variable humedad y Tukey al 5 %.

Análisis de Varianza (ANOVA)						Significancia * *		
CV= 3,6 %						Tukey (5 %)		
Datos	SC	G L	CM	F	P-valor	Tratamientos	Media	Rango
Error	0,14	6	0,02			T0	54,34	A
Repeticiones	0,05	2	0,02	1,00	0,4219	T1	70,55	C
Tratamientos	570,11	3	190,04	8433,62	<0,001	T2	70,55	C
Total	570,29	11				T3	69,61	B

Nota: T0 (Suelo + Hidrocarburo), T1 (Suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁴ UFC/mL”), T2 (suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁶ UFC/mL”) y T3 (suelo con hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁸ UFC/mL”).

Fuente: (InfoStat, 2015)

Elaborado por: El autor, 2018.

En la Tabla 13, se indica el promedio de los tratamientos para la variable humedad. Donde el T1 y T2 presentaron la mayor humedad del proceso con 70,5%, seguido de con 69,6% en T3 y finalmente T0 con 54,3%.

El C.V. es 3,56%, La prueba de Tukey al 5%, indica tres rangos de significancia categorizados como “A” para el T0; “B” para T3 y “C” para T1 y T2, esto indica que los valores de T1 y T2 fueron similares y oscilaron entre 70,55% de humedad, es decir todos los tratamientos a excepción del T1 y T2 son estadísticamente diferentes y altamente significativos.

Los datos de humedad reflejan que la cantidad de inóculo añadida fue igual en los distintos tratamientos; sin embargo la variación radicó en la influencia de las distintas concentraciones de las bacterias sobre el hidrocarburo, debido a que la bacteria tiene la capacidad de utilizar el hidrocarburo como fuente de carbono para su proceso metabólico

y mediante el proceso de intercambio catiónico realizado por las sales del suelo, la bacteria es capaz de asimilar las sales como N, P y S del estudio.

T1, T2 y T3 presentaron mayor porcentaje de humedad, puesto que las concentraciones varían en número de UFC/mL, donde el agua actúa como medio de transporte de nutrimentos y oxígeno a la célula para realizar sus procesos metabólicos y así potenciar al proceso de biorremediación. T3 a pesar de tener una carga mayor de UFC que T1 y T2 muestra valores similares correspondientes con la variable humedad, esto explica que pudieron haber existido bacterias no viables o en estado latente.

Los rangos de humedad oscilaron entre el 54,34y 69,61%, lo que significa que están dentro de rangos para procesos de biorremediación. Donde según (Verma, Bhargavaa, & Pruthi (2013); (Gómez, y otros, 2008) consideran que las condiciones óptimas para las bacterias en procesos de biorremediación se encuentran entre 30-90% de humedad de campo, recalando que la humedad afecta directamente al metabolismo bacteriano y condiciona el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, la misma que es influenciada por la temperatura.

Según Gómez, y otros (2008) menciona que en valores inferiores a los expuestos anteriormente la degradación se ve inhibida; destacando así que una baja humedad es directamente proporcional a la actividad metabólica, es decir a baja humedad baja actividad metabólica bacteriana.

3.3. Medición de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en peso seco iniciales y finales.

Tabla 14.

Degradación de HAPs iniciales y finales biorremediados.

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco (mg/kg).	HAPs Iniciales en peso seco (mg/kg).	HAPs Finales en peso seco (mg/kg).	% Degradado	Media del % de degradación de HAPs (TO)	Finales T1, T2, T3 en peso seco (mg/kg).	% Degradado	Media del % de degradación de HAPs (T1, T2, T3)	Parámetros Permisibles	
Acenaftaleno	8,20	7,00	14,21	78,10 %	0,10	98,78	99,25 %	Suelo uso Agrícola <0,50 mg/kg	Suelo uso Industrial <10 mg/kg
Benzo (a) Antraceno	7,30	0,10	98,63		0,10	98,63			
Fenantreno	32	0,10	99,69		0,10	99,69			
Naftaleno	65	0,10	98,85		0,10	99,85			

Elaborado por: El autor, 2018.

En la tabla 14, se indica los valores iniciales y finales de los HAPs más relevantes, donde todos los tratamientos iniciaron con 8,2 mg/kg de Acenaftaleno, 7,3 mg/kg de Benzo (a) antraceno, 32 mg/kg de Fenantreno y 65 mg/kg de Naftaleno. Al finalizar el ensayo se observa una notoria reducción a 0.1 mg/kg en cada uno de los hidrocarburos mencionados anteriormente en los tratamientos T1, T2 y T3, lo que resulta en un porcentaje total del 99,25 % de HAPs degradados.

Los tratamientos T1, T2 y T3, a pesar de no hallarse dentro de las condiciones ambientales ideales, lograron degradar un porcentaje superior de HAPs (99,25 %) en comparación con T0, que también resultó ser un tratamiento eficaz para la degradación de hidrocarburos debido a que el proceso de biorremediación se dio en un suelo de textura areno arcillosa y con condiciones controladas para este tipo de estudio , consiguiendo de esta manera cumplir con los parámetros estipulados por el TULAS; esta reducción se debe principalmente a la generación de metabolitos de *Pseudomonas fluorescens* en el proceso de degradación de HAPs, mismos que actuaron sobre el hidrocarburo activando y fragmentando anillos aromáticos inmersos dentro dela estructura de los HAPs como en el caso del Acenaftaleno y Fenantreno cuyo mecanismo de degradación se dio por mono o dioxidación en diferentes posiciones de las cadenas de carbono, seguido de una deshidratación de los di hidrodioles y una ruptura oxidativa, esto con el fin de reducir el tiempo de vida de los HAPs ya que rompiendo el número de añillos inmersos dentro de su estructura se logra transformar a productos más sencillo y menos tóxicos.

El tratamiento T3 (suelo con hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* + “ 10^8 UFC/mL”), es el tratamiento que muestra un mejor rendimiento para la degradación de HAPs, debido que al comparar los valores degradados de HAPs finales con los valores del análisis estadístico tiene concordancia directa, ya que fue el tratamiento que mostró

una mayor variación para las variables analizadas de pH y C.E., donde esta reducción se debe a la concentración utilizada en este tratamiento de *Pseudomonas fluorescens* que actúo sobre el hidrocarburo, acelerando el proceso metabólico y modificando las condiciones del suelo para que el proceso sea viable.

Izquierdo (2013) menciona que las reacciones enzimáticas son claves en el proceso de biorremediación e incluyen oxidaciones catalizadas por oxigenasas y peroxidasas. Las oxigenasas son oxido reductasas las cuales utilizan moléculas de O₂ con la finalidad de introducir oxígeno en el contaminante desestabilizándolo para que pueda ser mineralizado por la bacteria durante el proceso metabólico. Las dioxigenasas incorporan dos átomos de oxígeno, mientras que las monooxigenasas incorporan solo uno y el otro es reducido a H₂O. La oxigenasas son metalo enzimas que en su mayoría utilizan hierro en su centro activo para ligar el oxígeno molecular y activarlo antes de su transferencia al sustrato durante la catálisis.

Arrollo (2000) menciona que Los compuestos resultantes, que conllevan dos sustituyentes hidroxilo sirven de sustrato para el ataque de dioxigenasas para que se produzca la ruptura de anillo aromático, produciendo así una ruptura del enlace C-C y generando productos más sencillos.

Al final del ensayo y corroborando lo mencionado por He, y otros (2014) que mencionan que la concentración más óptima probada para procesos de degradación de hidrocarburos es 10⁸ UFC/mL, se puede observar que en concentraciones menores también se da el proceso de degradación de hidrocarburos como en el caso del T1 (Suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁴ UFC/mL”), y T2 (suelo + hidrocarburo + 150mL de *Pseudomonas fluorescens* “10⁶ UFC/mL”), donde también generan procesos

oxidativos que alteran las propiedades de los compuestos hidrocarbúricos, produciendo así un proceso de liberación de compuestos como alcanos de cadena larga y ácidos grasos.

3.4. Medición de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en peso seco

Tabla 15.

TPHs iniciales y finales

Hidrocarburos Totales de Petróleo en peso seco (mg/kg).	TPHs Iniciales	TPHs Finales	Parámetros Permisibles		PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE TPHs	Método utilizado
TPHs	104231	2649	Suelo uso Agrícola <2500 mg/kg	Suelo uso Industrial <4000 mg/kg	97,50%	EPA 8015D / MM-S-23

Elaborado por: El autor, 2018.

En la tabla 15, se indica los valores iniciales y finales de TPHs, donde los tratamientos iniciaron con 104231 mg/kg de TPHs, al finalizar el ensayo se observa valores inferiores a los iniciales con 2649 mg/kg de TPHs degradados, con un porcentaje de 97,5% de degradación

Esta reducción se debe a la acción de los metabolitos bacterianos producidos en el proceso de degradación del hidrocarburo por parte de la bacteria y posiblemente a la cinética de *Pseudomonas fluorescens* que contribuye a que se reproduzcan en menor tiempo produciendo esporas viables y resistentes; corroborando que la adición de microorganismos como los *Pseudomonas fluorescens* acelera el proceso de degradación de TPHs.

El género *Pseudomonas* que crece en presencia de TPHs, producen sustancias tenso activas (exudados producidos en el proceso metabólico entre la bacteria y el hidrocarburo), que son capaces de solubilizar compuestos no polares como los TPHs, además estas sustancias tienen la propiedad de acelerar el crecimiento bacteriano mejorando la actividad enzimática tanto de peroxidasas y oxigenasas que permitirán la oxidación de fracciones tóxicas del hidrocarburo, logrando así una mayor eficacia en el proceso de biorremediación.

En estudios realizados por García & Macedo (2014) mencionan que el género *Pseudomonas* en la degradación de hidrocarburos tiene la capacidad para degradar TPHs debido a que son organismos resistentes a la toxicidad como el hexano, combustibles de aviones, aceites minerales, benceno, tolueno, xilenos y fluoreno, como también otros productos de petróleo y componentes de gasolina, la razón se da debido a que en el proceso metabólico la bacteria genera una membrana celular extra, misma que actuará con el hidrocarburo generando exudados bacterianos, tales que harán que ingrese el hidrocarburo por la membrana citoplasmática de las células para poder darse el proceso metabólico y la transformación a productos más sencillos, lo que los convierten en organismos competentes para la degradación de compuestos de alto peso molecular como TPHs.

Según el RAOHE (2010) señala que los límites permisibles para sitios de uso industrial “donde la actividad principal abarca la elaboración, transformación o construcción de productos varios” (Tulas, 2012) son < 4000 mg/kg de TPH y < 1,5 mg/kg de HAPs (cero o perturbación insignificante); los resultados obtenidos por T1, T2 y T3 al final del ensayo corroboraron que el proceso de biorremediación de hidrocarburos se encuentran dentro de los límites establecidos por la ley, excepto el T0 que está por encima del límite

permisible, señalando que la biorremediación es una técnica factible y que contribuye a la degradación de los hidrocarburos en suelos contaminados.

Conclusiones

- En la investigación se aceptó la hipótesis alternativa (HA) que afirma que la bioaumentación utilizando *Pseudomonas fluorescens* promueve la degradación de hidrocarburos al reducir la cantidad de TPHs y HAPs en el suelo contaminado. De este modo, se demuestra ser una herramienta factible, sencilla y viable con el ambiente debido a los mecanismos de acción que genera *Pseudomonas fluorescens* sobre el hidrocarburo.
- *Pseudomonas fluorescens* degrada de mejor forma cuatro HAPs (Acenaftaleno, benzo a antraceno, fenantreno, naftaleno) de los 16 que se detectaron en los análisis iniciales y finales, demostrándose la importancia de biotransformación de la bacteria en estos compuestos tóxicos para el ambiente y el hombre.
- Se puede corroborar como en otros estudios que *Pseudomonas fluorescens* son bacterias que potencian la degradación de hidrocarburos con porcentajes relativamente altos gracias a su metabolismo bacteriano, impulsado por las reacciones enzimáticas generada en el proceso de degradación de moléculas como TPHs y HAPs.
- La cantidad de TPHs y HAPs degradados al finalizar la investigación se encuentran dentro de los límites permisibles para suelos industriales, cumpliendo con los parámetros estipulados en el RAHOE 1215, demostrándose la eficiencia de la bioaumentación con *Pseudomonas fluorescens* en procesos de biorremediación de hidrocarburos.
- El tratamiento T0 a pesar de no ser inoculado con la bacteria también degradó el hidrocarburo, demostrándose que la carba microbiana inicial del suelo es importante y contribuye directamente a la transformación del hidrocarburo.

Recomendaciones

- Probar diferentes texturas de suelo diferente (areno limosa), con el fin de establecer las concentraciones óptimas para el proceso de degradación de hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens* en estos suelos.
- Establecer condiciones ambientales en el laboratorio acordes al sitio donde ocurre la biorremediación. Por ejemplo, en climas templados (procesos de biorremediación de hidrocarburos ex situ). Se podrían colocar focos, paneles solares o calefactores para lograr una temperatura adecuada para potenciar el metabolismo de *Pseudomonas fluorescens*.
- Probar concentraciones entre 10^6 y 10^8 UFC de esporas del inóculo de la bacteria para ver su comportamiento en la degradación de los hidrocarburos y evaluarlas frente a estudios con las mismas concentraciones en diferentes sitios.

Bibliografía

- Acuña, A. J., Pucci, O. H., & Pucci, G. (2013). Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina. *Ecosistemas*, 12.
- Akpan, E., Kingsley, O., & Nwadinigwe. (2013). Bioremediation of Hydrocarbon Polluted Soil in the Lowland Forest Ecosystem in theNiger Delta through Enhanced Natural Attenuation Process (ENAP). *International Journal of Applied Science and Technology*, 56-61.
- Alanís, E., & Guerrero, I. (1999). Pseudomonas en Biotecnología . *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 63-70.
- Amurrio Ordoñez , P., & Poma Sajama, V. (Noviembre de 2015). Physicochemical properties and seasonal variations of soils in an altitudinal transect of the lluto county, la paz, bolivia. *Scielo*, 32(4), 4-6.
- Aquiahuatl, M. D., Volke Supúlveda, T., Prado Barragán, L. A., Shirai Matsumoto, K., Ramírez Vives, F., & Salazar Gonzáles, M. (2012). *División de Ciencias biológicas y de Salud*. México: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.
- Arrollo, M. (2000). APLICACIÓN DE SISTEMAS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS Y AGUAS CONTAMINADAS POR HIDROCARBUROS. *Protección Ambiental de suelos*, 34-43.
- Authority Environment Protection. (2014). *Best Practice Note: LANDFARMING*. EPA.

- Autino, J. C., Romanelli, G. P., & Ruíz, D. (2013). *Introducción a la química orgánica*. La Plata: Universidad de la Plata.
- Barnett, H. L. (1967). Illustrated genera of imperfect fungi. Library of congress catalog NO, 60-12998.
- Bello, D., Santo , T., Julio, D., María, E., Bell, A., Torres, E., & Villa, P. (2006). Purificación parcial del pioverdín a partir de caldos de fermentación de *Pseudomona aeruginosa* PSS. *ICIDCA*, 21-23.
- Benavides, J., Qunitero, G., Guevara Viscaino, A. L., Jaimes Cáceres, V. C., Guitiérrez Riaño, S. M., & Miranda García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*, 83-87.
- Buendia, R. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol. *FIGEMMG*, 12.
- Castillo Vera, H. E. (2013). Incidencia de microorganismos eficientes más abonos orgánicos en el comportamiento agronómico del cultivo de cebolla (*Allium cepa*) en el Cantón La Maná. *UTEQ*, 4-5.
- Constitución de la República del Ecuador. (2013). *SUMAK KAWSAY*. Quito: Quisento.
- Córdoba Pizarro, M. D. (2009). *Desarrollo de un medio de cultivo óptimo con diferentes fuentes de carbono, para pseudomonas aeruginosa y bacillus cereus, presentes en suelos que contienen hidrocarburos (TPH), provenientes de PETROAMAZONAS S.A., ubicado en la Provincia de Sucumbíos*. Quito: SANGOLQUÍ / ESPE / 2009.

- Cruz, E. (2014). *Academia.edu/IMPACTO AMBIENTAL* . Obtenido de http://www.academia.edu/11382381/IMPACTO_AMBIENTAL_ANTEPROYECTO
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants. *NCBI*, 34.
- Esaú López, L., Hernández, M., Colín Castro, C., Ortega Peña, S., Cerón , G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio. *CENIAQ*.
- Escalante, R. M. (2002). *BIODEGRADACIÓN DE CRUDO DE PETROLEO EN TERRARIOS*. Calí: Universidad de Calí Colombia.
- Estrella, S. (2012). *ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO EN AGUA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GASES*. QUITO: DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y LA CONSTRUCCION.
- Ferrera, R., Rojas, N. G., Poggi, H. M., Alarcón, A., & Cañizares, R. O. (2013). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *MEDIGRAPHIC*, 21-24.
- García, & Macedo, A. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *ResearchGate*, 644.
- Gary, J. &. (1980). *Refino de petróleo*. New York: Reverté S.A.
- Gavilanez, T. (2013). *Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación*. Ambato-Ecuador.

- Gómez, S., Diana, G., Hernández, A., Hernández, C., Lozada, M., & Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA*, 76-81.
- Guigón López, C., Guerrero Prieto, V., Vargas Alborez, F., Carvajal Millán, E., Dolores Ávila, G., Bravo Luna, L., & Lorito, M. (2010). Molecular Identification of *Trichoderma* spp. Strains, in vitro Growth Rate and Antagonism against Plant Pathogen Fungi. *mex. fitopatol vol.28 no.2 Texcoco*, 7.
- Hamaraya, S., Kishira, H., Kasai, Y., & Shutsubo, K. (2012). Petroleum biodegradation in marine environments. *Molecular Microbiology and Biotechnology*, 63-70.
- He, Y., Duan, X., & Liu, Y. (2014). *Enhanced bioremediation of oily sludge using co-culture of specific bacterial and yeast strain*. China: Journal of Chemical Technology and Biotechnology.
- Ingeniería Energética General. (2013). Grados API y Gravedad específica de los Hidrocarburo. *Energianow*.
- Izquierdo, A. (2013). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo . Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Kästner, M. (2008). *Degradation of Aromatic and Polyaromatic Compounds*. Wiley Online Library.

- Kraus, R. (2012). *Petróleo: prospección y perforación*. Obtenido de <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo3/75.pdf>
- Lafortune, I., Juteau, P., Déziel, E., & Villemur, R. (2009). Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem. *PUBMED*, 23-25.
- Larrea, C. (2013). *Boletín informativo spondylus*. Quito: Universidad Andina Simón Bolívar. Obtenido de [http://www.uasb.edu.ec/UserFiles/372/File/pdfs/PAPER%20UNIVERSITARIO/2013/CarlosLarrea%20\[ElParqueNacionalYasuni\].pdf](http://www.uasb.edu.ec/UserFiles/372/File/pdfs/PAPER%20UNIVERSITARIO/2013/CarlosLarrea%20[ElParqueNacionalYasuni].pdf)
- Mallick, S., Chakraborty, j., & Dutta, T. K. (2011). Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *PUBMED*, 62-92.
- Martínez, V. E., & López S, F. (Abril de 2015). Effects of Hydrocarbon Pollutants on the Physical and Chemical Properties of Clay Soil. *Redalyc.org*, 7(2), 7-8.
- Mendelssohn, I., Andersen, G., Baltz, D., Caffey, R., Carman, K., Flegger, J., . . . Maltby, E. (2012). Oil Impacts on Coastal Wetlands: Implications for the Mississippi River Delta Ecosystem after the Deepwater Horizon Oil Spill. *BioScience*.
- Ministerio de Hidrocarburos. (2010). *Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas (RAOHE) 1215*. Quito- Ecuador.

Nahuel, I., Reussi Calvo, Echeverria , H. E., & Sainz Rosas, H. (Diciembre de 2016).

Comparación de métodos de determinación de nitrógeno y azufre en planta:
implicancia en el diagnóstico de azufre en trigo. *Scielo*, 26(3).

Nápoles , J., Marañón , A., Cumba , F., Anllo, Y., & Ábalos , A. (2012).

TRATABILIDAD DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO
APLICANDO MICROCOSMOS. *Centro de Estudios de Biotecnología
Industrial. Facultad de Ciencias Naturales*, 34-45.

Narváez, I. (2009). *El petróleo en el Ecuador*. Quito.

Ñustez Cuartas, D. C. (2012). *BIORREMEDIACIÓN PARA LA DEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS TOTALES PRESENTES EN LOS SEDIMENTOS DE
UNA ESTACIÓN DE SERVICIO DE COMBUSTIBLE*. Pereira:
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.

Oropeza, J. (Octubre de 2010). DIVERSIDAD MICROBIOLÓGICA DE
BACTERIAS Y HONGOS EN SUELOS IMPACTADOS CON PETRÓLEO,
PROVENIENTES DE YARACAL, ESTADO FALCÓN VENEZUELA.
Valencia.

Ortiz, E. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.
Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente, 51-60.

Pardo, J. L., Perdomo, M. C., & Benavides, J. (2014). Efecto de la adición de
fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en
suelos contaminados con petróleo. *NOVA*, 12-15.

- Patel V, J. S. (2012). Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *NCBI*, 107-122.
- Puglisi, E. C. (2014). Bioavailability and degradation of phenanthrene in compost amended soils. *ResearchGate*.
- RAOHE. (2010). *HIDROCARBURIFERAS, REGLAMENTO AMBIENTAL DE ACTIVIDADES*. Quito: eSilec Profesional - www.lexis.com.ec.
- Registry Agency for toxic substances and disease. (Agosto de 1999). *Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)*. Obtenido de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts123.pdf>
- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J., & Gortáres, P. (2013). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *QUIMICA VIVA*, 124-128.
- Rockne, K., Chee-Sanford, J., Sanford, R., Brian, P., James, T., & Staleyand, S. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions . *Applied and Environmental Microbiology* , 1595-1601.
- Rondinone, S., & Giovanniello, O. (2000). Pruebas Bioquímicas para identificación de bacterias de importancia clínica. En *Pruebas de Bacitracina/ Sulfametoxazol-Trimetropina (SXT)* (págs. 580-589). Madrid: Medica Panamericana SA.
- Salvador, L., & Fernandez. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas*. Barcelona: Universidad de Barcelona.

- Serrano, V. (2015). *Academia.edu/INFORME SOBRE EL PETROLEO*. Obtenido de http://www.academia.edu/12915493/INFORME_SOBRE_EL_PETROLEO
- Shafy, A., & Mansour, M. (2015). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet*, 23-25.
- Siguenza, F. (2007). *El Pétróleo en el Ecuador y sus antecedentes locales*. Quito: Amazanga. Obtenido de <http://cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/teco626.pdf>
- Silva, R. (2013). *La Historia del Petróleo*. Quito: Amazanga. Obtenido de <http://cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/teco626.pdf>
- Singleton, D. R., Sangaiah, R., Gold, A., & Ball, L. M. (2015). Identification and quantification of uncultivated Proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil. *NCBI*, 11.
- Terry, M., Folwell, B., Mckew, B., & Sanni, G. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat Biosystm*.
- Thion, C., Beguiristain, T., & Leyval, C. (2013). Inoculation of PAH-degrading strains of *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* in rhizospheric sand and soil microcosms: microbial interactions and PAH dissipation. *PUBMED*, 7-9.
- Torres. (Noviembre de 2009). *bdigital*. Obtenido de http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf
- Torres, D. (2003). *Papel de los microorganismos en la degradación de compuestos tóxicos*. España: Ecosistemas .

- Total Petroleum Hydrocarbons TPH. (Agosto de 1999). Agency for toxic substances and disease. Boston: Fangos. Obtenido de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts123.pdf>
- Towell, M. B. (2011). Mineralisation of target hydrocarbons in three contaminated soils from former refinery facilities. *PUBMED*, 5-10.
- Tsibart, a. S. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Sources, behavior, and indication significance . *Eurasian Soil Sci*, 728-741.
- TULAS. (2012). Libro VI, anexo 2. *Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados*, págs. 250-366.
- Tulas. (2012). NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL DEL RECURSO SUELO Y CRITERIOS DE REMEDIACIÓN PARA SUELOS CONTAMINADOS. En *LIBRO VI ANEXO 2* (págs. 349-358). Quito.
- Vallejo, V., Salgado, L., & Roldán, F. (2010). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *DDIGITAL Revista Colombiana de Biotecnología*, 32-34.
- Varela, G. (2011). *FISIOLOGIA Y METABOLISMO BACTERIANO*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf>
- Verma, S., Bhargavaa, R., & Pruthi, V. (2013). *Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar*. India: Int Biodeter Biodegr.
- Warner, S. (2014). *SEMIVOLATILE ORGANIC COMPOUNDS BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC/MS)*. Dionex Corporation.

Wiley, J., Shewood, L., & Woolverton, C. (2012). MICROBIOLOGIA DE
PRESCOTT, HARLEY Y KLEIN. *AXON*.

Anexos

Anexo 1. Propiedades de los 16 HAPs más peligrosos

Compuesto	Nº de anillos	Peso Molecular	Solubilidad en agua (mg/L)	Factor carcinogénico
1 Naftaleno	2	128	31,7	0,001
2 Acenaftileno	3	152	4,00	0,001
3 Acenafteno	3	154	3,92	0,001
4 Fluoreno	3	166	4,18	0,001
5 Fenantreno	3	178	4,57	0,001
6 Antraceno	3	178	4,54	0,01
7 Fluoranteno	4	202	5,22	0,001
8 Pireno	4	202	5,18	0,001
9 Benzo[a]antraceno	4	228	5,91	0,1
10 Criseno	4	228	5,80	0,01
11 Benzo [b]fluoranteno	5	252	6,00	0,1
12 Benzo[k]fluoranteno	5	252	5,91	0,1
13 Benzo[a]pireno	5	252	6,75	1
14 Dibenzo[a,h]antraceno	6	278	6,50	5
15 Indeno[1,2,3-cd]pireno	6	276	6,50	0,1
16 Benzo[g,h,i]perileno	6	276	6,50	0,001

NOTA: Adaptado de (Kästner, 2008)

Anexo 2. Requerimientos para la biorremediación

Requerimientos Microbianos	Nutrientes (N, P, K, S, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu), elementos traza, fuente de carbono (Hidrocarburo), aceptores de electrones.
Otros Requerimientos	Temperatura (20°-42 °C), Humedad (30-80% de la capacidad de campo, pH (6-8), textura del suelo, grado API del hidrocarburo.

Nota: Adaptado de (Buendia, 2012).

Anexo 3. Conceptos y estrategias de biorremediación (In situ)

Bioestimulación	Técnica que consiste en estimular o potenciar al suelo mediante la incorporación de nutrientes (N, P, K, S, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu), elementos traza, aceptores de electrones que permiten la estimulación de la carga microbiana autóctona para que potencien al proceso de degradación.
Bioaumentación	Técnica que consiste en la adición de cultivos microbianos con características biodegradatorias para acelerar el proceso de degradación

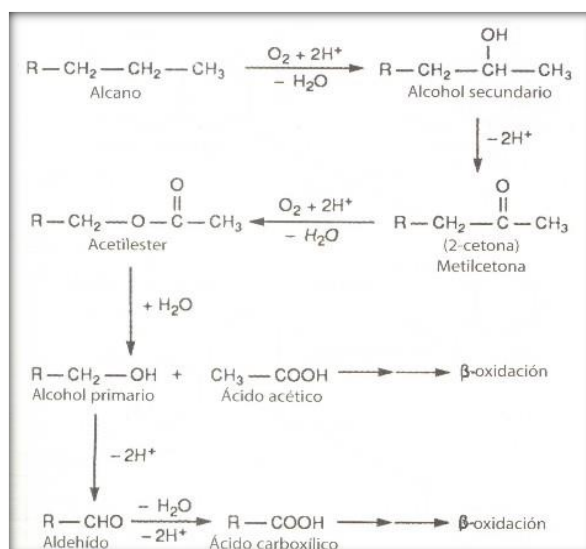
NOTA: Adaptado de: (Benavides, y otros, 2006)(Vallejo, Salgado, & Roldán, 2010) ((Gavilanez, 2013)

Anexo 4. Conceptos y estrategias de biorremediación (Ex situ)

Landfarming	Proceso biológico que utiliza microorganismos como algas, bacterias u hongos para biotransformar sustancias contaminantes inmersas en los suelos en productos más sencillos.
Biorreactores	Depósito donde se dan una serie de reacciones biológicas debido a la acción de enzimas o microorganismos; aquí se utiliza la descomposición biológica con el fin de producir crecimiento de microorganismos con capacidad degradativa.

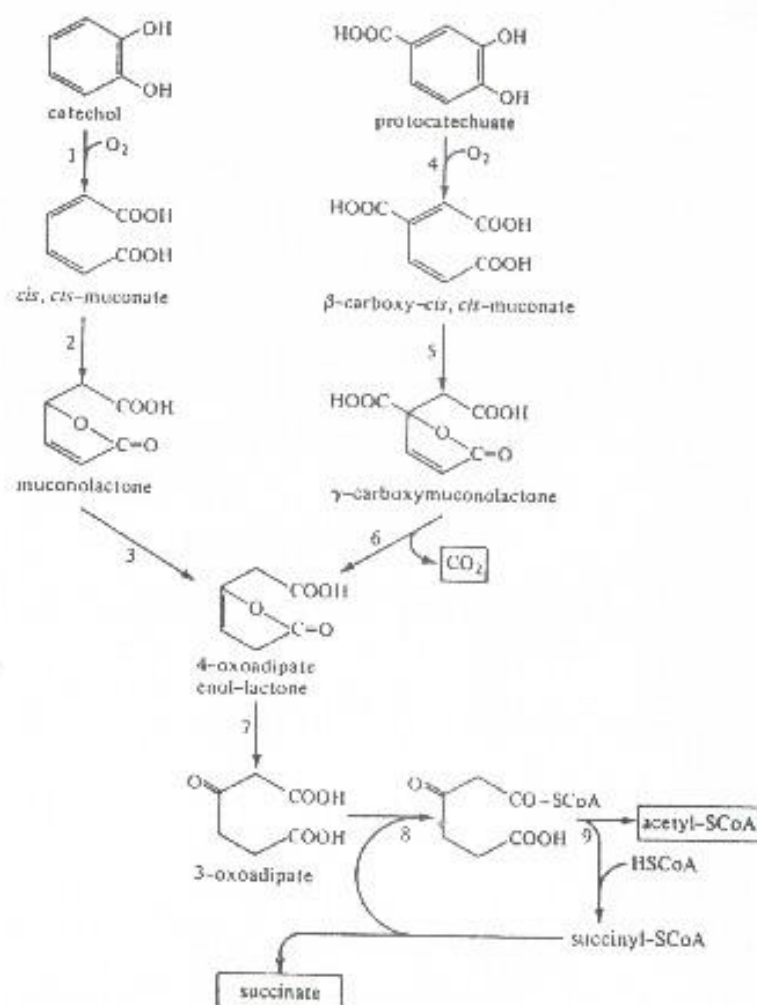
NOTA: Adaptado de: (Gavilanez, 2013)(Benavides, y otros, 2006)(Vallejo, Salgado, & Roldán, 2010)(Authority Environment Protection, 2014)

Anexo 5. Ruta metabólica de TPHs por *Pseudomonas*



Nota: Rutas de degradación de n-alcanos e hidroxilación, son catalizados por el mismo grupo de enzimas. En las bacterias las enzimas participantes son monooxigenasas, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenas (Torres, 2009).

Anexo 6. Ruta metabólica de HAPs por *Pseudomonas*



Nota: Degradación de tolueno por *Pseudomonas*(Arrollo, 2000).

Anexo 7. Preparación de Agares empleados

Tipo de Agar	Procedimiento
TSA (Trypticase Soy Agar)	Disolver 40 g en 1L de agua destilada estéril, mezclar bien el medio por aproximadamente 10 minutos y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
TSB (Trypticase Soy Broth)	Disolver 30 g en 1L de agua destilada estéril, mezclar bien el medio por aproximadamente 10 minutos y autoclavar a 121°C durante 15 minutos
Cetrymide	Disolver 23 g en 1L de agua destilada estéril, agregar 5 mL de Glicerina, mezclar bien el medio por aproximadamente 10 minutos y autoclavar a 121°C durante 15 minutos

Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo 8. Método KJELDAHL para “Determinación de Nitrógeno y Materia orgánica”

Este método da una idea de la cantidad de nitrógeno existente en el suelo y la relación carbón/nitrógeno, misma que tiene importancia para saber el grado de la materia orgánica y la disponibilidad para los microorganismos.

Equipos:

- Balanza analítica.
- Aparato de Kjeldahl.
- Matraces de 900 mL
- Erlenmeyer de 500 mL
- Bureta de precisión de 75 mL

Reactivos:

- Ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4
- Solución de ácido sulfúrico

Procedimiento:

- Partir de una muestra de suelo tamizado a 0,5 mm perfectamente homogeneizada
- Pesar 2g de muestra
- Humedecer la muestra con una piseta
- Homogeneizar y colocar sobre la plancha de mineralización
- Calentar la muestra hasta la decoloración completa de la solución, (entre dos y tres horas)
- Conectar el matraz al aparato de destilación
- Destilar de 300 mL Verificar el fin de la destilación con ayuda de un papel indicador de pH
- El pH debe estar neutro a ligeramente ácido, esto indica el fin de la destilación del amonio.
- Titular la solución con la solución de hidróxido de sodio. El viraje de color se hace del rojo al verde. Si es posible utilizar un agitador magnético para la agitación. En el caso de que trabajemos con una solución de ácido bórico para

recoger el destilado, el viraje de color se hace del verde al rojo.(Nahuel, Reussi Calvo, Echeverria , & Sainz Rosas, 2016)

Anexo 9. Método Olsen modificado

Extracción por una solución alcalina (bicarbonato de sodio N/2 de pH 0,5).

Equipo

- Balanza de precisión, (1 mg)
- Colorímetro equipado con un filtro de 660 nm
- Erlenmeyer de 125 mL
- Balones aforados de 100 mL
- Embudos vástago largo de 8 a 9 cm de diámetro
- Pipetas automáticas de 5 y 10 mL
- Probeta de 100 mL
- Tubos para colorimetría.

Reactivos

- Solución de bicarbonato de sodio (CO_3HNa) 0,5N de un pH de 8.5.

Procedimiento

- Pesar 5g de suelo con varias tomas. La pesada se efectuará directamente en un Erlenmeyer de 125 mL
- Agregar 70 mL de la solución de bicarbonato de sodio por medio de una probeta
- Instalar los embudos (con papel filtro) sobre balones aforados de 100 mL
- Sacar el balón y aforarlo solución extractora o agua destilada
- Tapar el balón y homogeneizar cuidadosamente por volteadas sucesivas. (Amurrio Ordoñez & Poma Sajama, 2015)

Anexo 10. Cationes de cambio “Ca, Mg, K, Na”

Este método sirve para determinar el grado de formación de las arcillas de su naturaleza. También permite obtener el porcentaje de saturación en relación con la capacidad total de intercambio.

Equipo

- Espectrofotómetro de absorción atómica, equipado con un mechero aire/acetileno
- Balanza de precisión, 1 mg
- Agitadores (varillas de 10 cm de longitud y 0,5 cm de diámetro)
- Vasos de 100 mL
- Embudos, vástago largo de 8 a 10 cm de diámetro
- Balones aforados de 100 mL
- Vasos de 50 mL de plástico
- Distribuidor automático de 5 mL
- Pipetas automáticas de 5mL
- Balones aforados de diferentes volúmenes

Reactivos

- Solución de acetato de amonio N a pH 7

Procedimiento

- Partir de una muestra de suelo tamizado a 0,5 mm perfectamente homogeneizada.
- Pesar 5 g de suelo lo más precisamente posible en la balanza de precisión (a 1 mg), con varias tomas. La pesada se efectuará directamente en un vaso de 100 mL.
- Agregar 50 mL de esta solución extractora (acetato de amonio)
- Dejar en contacto durante 18 horas
- Instalar el embudo con su filtro arriba de un balón aforado de 100 mL
- Agregar en el vaso alrededor de 20 mL de solución extractora y dejar en contacto una hora
- Filtrar

- Dejar escurrir completamente el suelo y lavar el filtro (con la piseta)
- Sacar el balón y aforarlo muy precisamente con la solución extractora (o agua destilada) por medio de una piseta

Preparación del espectrofotómetro

- Conectar el espectrofotómetro y poner las lámparas en contacto, no pasar bruscamente a la intensidad máxima, esperar alrededor de 5 segundos entre cada aumento de corriente. Una lectura de buena calidad demanda por lo menos 6 horas de estabilización para la parte electrónica y alrededor de 20 nm para las lámparas.

Lectura

- Introducir el tubo de aspiración dentro del balón que contiene la muestra a dosificar, esperar la estabilización de la lectura y anotar la lectura obtenida.
- El resultado leído debe situarse dentro de los dos primeros tercios de la curva de estandarización. (Martínez & López S, 2015).

Anexo 11. Métodos EPA

A. Método EPA 8015D / MM-S-23 “TPHs”

Este método se puede usar para determinar las concentraciones de varios materiales no halogenados, compuestos orgánicos volátiles y compuestos orgánicos semi volátiles por cromatografía de gases. Es aplicable para trietilamina e hidrocarburos de petróleo. Los hidrocarburos de petróleo incluyen el rango de gasolina orgánico y diésel.

Aparatos y materiales

- Sistema de cromatógrafo de gases / espectrómetro de masas
- Cromatógrafo de gases
- Columna espesor de película de 30 mm x 0,25 mm ID (o 0,2 mm ID) 1 µm
- Columna capilar de sílice fundida revestida de silicona (J & W Scientific DB-5 o equivalente).

Análisis cromatográfico de gases

Las muestras se analizan en un conjunto denominado secuencia analítica, la secuencia comienza con la verificación de calibración seguida de análisis de extracto de muestra. Adicional se recomienda encarecidamente analizar los estándares de verificación a lo largo de 12 horas, especialmente para muestras que contienen concentraciones visibles de material oleoso.

La secuencia finaliza cuando el conjunto de muestras ha sido inyectado o cuando el tiempo de retención o % de diferencia se excedieron de los criterios de CC.

Si se exceden los criterios, inspeccione el sistema de cromatografía de gases para determinar la causa y realizar cualquier mantenimiento que sea necesario antes de recalibrar y proceder con análisis de muestra. Todos los análisis de muestra realizados con calibración estándar externa deben estar entre corchetes con los análisis de calidad de datos aceptables (por ejemplo, calibración y tiempo de retención).

Las muestras se analizan con la misma configuración de instrumento que se utiliza durante la calibración. Cuando se usa el Método para la introducción de la muestra, se advierte a los analistas que abriendo un vial de muestra o extrayendo una alícuota de un vial sellado comprometerá a que las muestras sean fácilmente volatilizadas. Por lo tanto, se recomienda que los analistas preparen dos alícuotas para el análisis de purga y trampa.

El extracto de muestra cae dentro de la ventana de tiempo de retención diaria. La confirmación puede ser necesario en una segunda columna o por GC / MS.

El rendimiento de todo el sistema analítico debe verificarse cada 12 horas, utilizando los datos recopilados de los análisis de espacios en blanco, estándares y muestras.

B. Método EPA 8270 D/MM-S-22 “HAPs”

El método 8270 se puede usar para cuantificar la mayoría de los compuestos orgánicos neutros, ácidos y básicos compuestos que son solubles en cloruro de metileno y que pueden eludirse, sin derivatización, como picos agudos de una columna capilar de sílice fundida cromatográfica de gases recubierta con una silicona ligeramente polar. Dichos compuestos incluyen hidrocarburos aromáticos polinucleares, clorados hidrocarburos y pesticidas, ésteres de ftalato, ésteres de órgano fosfatos, nitrosaminas, haloéteres, aldehídos, éteres, cetonas, anilinas, piridinas, quinolinas, nitrocompuestos aromáticos y fenoles, incluidos los nitro fenoles.

En la mayoría de los casos, el Método 8270 no es apropiado para la cuantificación de multi componentes analitos, por ejemplo, Aroclors, Toxaphene, Clordano, etc., debido a la sensibilidad limitada para aquellos analitos.

Aparatos y materiales

- Sistema de cromatógrafo de gases / espectrómetro de masas
- Cromatógrafo de gases
- Columna espesor de película de 30 mm x 0,25 mm ID (o 0,2 mm ID) 1 µm
- Columna capilar de sílice fundida revestida de silicona (J & W Scientific DB-5 o equivalente).

Análisis cromatográfico de gases

Las muestras se analizan en un conjunto denominado secuencia analítica, la secuencia comienza con la verificación de calibración seguida de análisis de extracto de muestra. Adicional se recomienda encarecidamente analizar los estándares de verificación a lo largo de 12 horas, especialmente para muestras que contienen concentraciones visibles de material oleoso.

La secuencia finaliza cuando el conjunto de muestras ha sido inyectado o cuando el tiempo de retención o porcentaje de diferencia se excedieron de los criterios de CC.

Si se exceden los criterios, inspeccione el sistema de cromatografía de gases para determinar la causa y realizar cualquier mantenimiento que sea necesario antes de recalibrar y proceder con análisis de muestra. Todos los análisis de muestra realizados con calibración estándar externa deben estar entre corchetes con los análisis de calidad de datos aceptables (por ejemplo, calibración y tiempo de retención).

Las muestras se analizan con la misma configuración de instrumento que se utiliza durante la calibración. Cuando se usa el Método para la introducción de la muestra, se advierte a los analistas que abriendo un vial de muestra o extrayendo una alícuota de un vial sellado comprometerá a que las muestras sean fácilmente volatilizadas. Por lo tanto, se recomienda que los analistas preparen dos alícuotas para el análisis de purga y trampa.

El extracto de muestra cae dentro de la ventana de tiempo de retención diaria. La confirmación puede ser necesario en una segunda columna o por GC / MS.

El rendimiento de todo el sistema analítico debe verificarse cada 12 horas, utilizando los datos recopilados de los análisis de espacios en blanco, estándares y muestras. (Warner, 2014)

Anexo 12. Resultado de análisis físico químico del suelo sano



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cliente: LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Dirección: Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid

Contacto: Tania Cevallos

Cantidad de muestras: 1

Fecha de Ingreso: Junio 05, 2017

Código de Laboratorio: SA17-467

Teléfono: 23962-900

E-mail: luachi@ups.edu.ec

Tipo de Muestra: Sustrato

Fecha Emisión: Enero 17, 2018

Fecha de Análisis: Enero 03 al 12, 2017

Identificación de Usuario:

SUELO ORIENTE

N° de Informe: 18020

INFORME DE RESULTADOS

Nitrógeno ^a	Fósforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Sodio	Azufre	Hierro	Manganeso	Cobre	Zinc	Boro
%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g
0,28	0,27	0,04	0,56	0,49	0,05	0,13	38535	453,80	179,83	1505,20	133,82

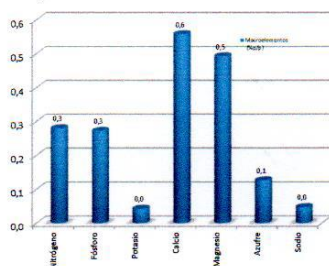


Gráfico 2.- Contenido de macroelementos

Método de análisis:
P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn - Colorimetría, Fotometría de Flama y Absorción Atómica;
*N- Kjeldahl;
Simbología:
ppm/100g: partes por millón en cien gramos de muestra;
%: porcentaje

Nota Aclaratoria:

Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.

La muestra fue analizada posterior a la incineración y tratada con agentes ácidos de acuerdo al protocolo ISA

Ing. Agr. Orlando Cuataviscusi
Técnico de Suelos y Agua

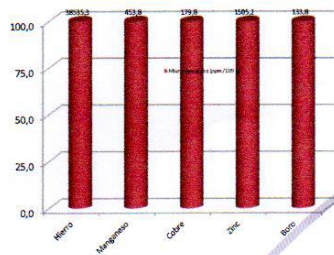


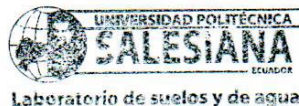
Gráfico 1.- Contenido de microelementos

Datos Complementarios:

Cenizas 90,2 %
Materia orgánica 9,8 %

Quím. De Alim. Paola Simbana
Responsable de Laboratorio

Pág. 1 de 1



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (0) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

Anexo 13. Resultado de análisis físico químico del suelo contaminado



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cliente: LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Dirección: Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid

Contacto: Tania Cevallos

Cantidad de muestras: 1

Fecha de Ingreso: Diciembre 01, 2017

Código de Laboratorio: SA18-016

Identificación de Usuario:

TCH

Teléfono: 23962-900

E-mail: luachi@ups.edu.ec

Tipo de Muestra: Sustrato

Fecha Emisión: Enero 17, 2018

Fecha de Análisis: Enero 03 al 12, 2018

Nº de Informe: 18021

INFORME DE RESULTADOS

Nitrogeno*	Fósforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Sodio	Azufre	Hierro	Manganeso	Cobre	Zinc	Boro
%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g
1,28	0,08	0,05	0,47	0,28	0,08	0,06	15844	171,53	37,13	1715,51	90,25

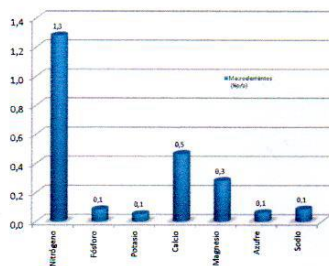


Gráfico 2.- Contenido de macroelementos

Método de análisis:
P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn - Colorimetría, Fotometría de Flama y Absorción Atómica;
*N- Kjeldahl.

Simbología:
ppm/100g: partes por millón en cien gramos de muestra;
%: porcentaje

Nota Aclaratoria:
Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.

La muestra fue analizada posterior a la incineración y tratada con agentes ácidos de acuerdo al protocolo LS4

Ing. Agr. Orlando Guatavisi
Técnico de Suelos y Agua



Laboratorio de suelos y de agua

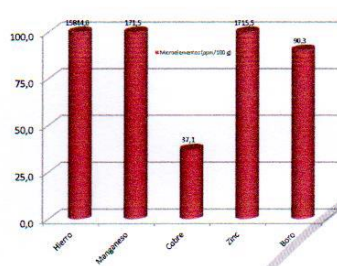


Gráfico 1.- Contenido de microelementos

Datos Complementarios:

Cenizas 81,6 %
Materia orgánica 18,4 %

Quím. De Alim. Paola Simbaña
Responsable de Laboratorio

Pág. 1 de 1

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.

Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

Anexo 14. Resultado de análisis físico químico del suelo Biorremediado



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Ciente: LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Dirección: Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid

Contacto: Tania Cevallos

Cantidad de muestras: 1

Fecha de Ingreso: Diciembre 01, 2017

Código de Laboratorio: SA18-017

Identificación de Usuario:

TSH

Teléfono: 23962-900

E-mail: lhuachi@ups.edu.ec

Tipo de Muestra: Sustrato

Fecha Emisión: Enero 17, 2018

Fecha de Análisis: Enero 03 al 12, 2018

N° de Informe: 18022

INFORME DE RESULTADOS

Nitrogeno*	Fósforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Sodio	Azufre	Hierro	Manganeso	Cobre	Zinc	Boro
%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	%p/p	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g	ppm/100g
0,57	0,19	0,05	0,45	0,34	0,05	0,08	24793	354,98	36,76	406,79	126,47

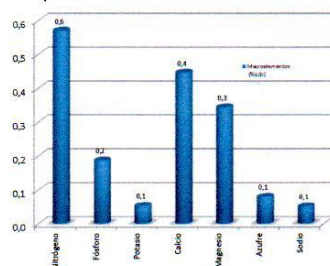


Gráfico 2.- Contenido de macroelementos

Método de análisis:
P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn - Colorimetría, Fotometría de Plama y Absorción Atómica;
*N- Kjeldahl;
Simbología:
ppm/100g: partes por millón en cien gramos de muestra;
%: porcentaje

Nota Aclaratoria:

Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente.

La muestra fue analizada posterior a la incineración y tratada con agentes ácidos de acuerdo al protocolo ISA

Ing. Agr. Orlando Chatavisi
Técnico de Suelos y Agua

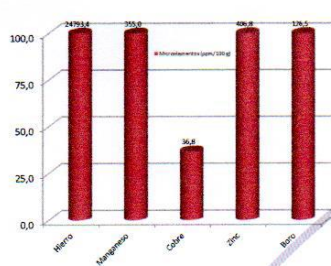


Gráfico 1.- Contenido de microelementos

Datos Complementarios:

Cenizas 87,2 %
Materia orgánica 12,8 %

Quím. De Alim. Paola Simbaña
Responsable de Laboratorio

Pág. 1 de 1



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

Anexo 15. Resultados de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) e Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en peso seco del suelo contaminado al inicio del ensayo



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA
DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito- Telf: 3962800

Atn: Ing. Laura Huachi
Proyecto: Muestras de Suelo
Muestra Recibida: 19-jul-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo
Análisis Completado: 31-jul-17
Número reporte Gruentec: 1707268-S001

Rotulación Muestra:	MUESTRA 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	08-jul-17	
No. Reporte Gruentec:	1707268-S001	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenaftaleno mg/kg *	8.2*	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafteno mg/kg *	<0.5	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.5	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	7.3*	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	1.3	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	32*	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.5	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3-c,d)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg *	65*	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	104231	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-006

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%; TPH suelo = 30%

Cálculo: $C \pm U$ (Ux100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

Anexo 16. Resultados de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) e Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en peso seco del suelo contaminado al final del ensayo evaluado por tratamiento con sus respectivas repeticiones.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S001

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 0 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d. ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S001	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenafaleno mg/kg ^(1,2)	5.3	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafeno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	8.2	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. DAE LE 20 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%

Cálculo: $G \pm U$ ($U \times G / 100$) en donde: G=valor medido; U= incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3952800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S002

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 0 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d. ⁿ⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S002	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenafaleno mg/kg ^(1,2)	6.3	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafeno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	11	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 20 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $C \pm (U \times C / 100)$ en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S003

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 0 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d. ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S003	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenafaleno mg/kg ^(1,2)	9.5	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafeno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	13	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 20 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d. - No Determinado

n) n.d. fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $U = \pm (U \times C / 100)$ en donde: C=valor medido; U= Incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atr: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S004

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 1 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d. ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S004	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenafaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafeno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 20 05-005

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d. - No Determinado

n) n.d. fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $C \pm U$ (U=C/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3982800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S005

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 1 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d. ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S005	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenfteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 20 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d. - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $G \pm (U \times G / 100)$ en donde: G=valor medido; U= incertidumbre %.



Acreditación N° OAE LE 20 05-008
LABORATORIO DE ENSAYOS

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito- Telf: 3962600

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S006

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 1 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d. ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S006	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenafaleno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafeno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0,1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 20 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d. - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $U = \frac{C}{\sqrt{2}} \times 100$ en donde: C=valor medido, U= incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S007

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 2 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d. ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S007	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenafaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafeno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 20 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d. - No Determinado

n) n.d. fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $G \pm U$ (µg/100) en donde: G=valor medido; U= incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

DIRECCIÓN: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito- Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S008

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 2 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d ⁿ⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S008	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenafaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafeno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $C \pm U$ (1hC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCIÓN: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S009

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 2 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S009	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenfteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $C \pm (U \times C / 100)$ en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Ciente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S010

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 3 REP 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S010	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenaftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Parámetros Orgánicos en peso seco:		
Hidrocarburos Totales de petróleo (C8-C40) mg/kg ^(1,2)	2649	EPA 8015 D / MM-S-23

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 20 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S011

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 3 REP 2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d. ⁽¹⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S011	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenafaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafeno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d. - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $C \pm U = (U \times C / 100)$ en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

DIRECCION: Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson -Quito Telf: 3962800

Atn: Lic. Laura Huachi

Proyecto: Muestras de Suelo - Ensayo 1

Muestra Recibida: 20-dic-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Suelo

Análisis Completado: 04-ene-17

Número reporte Gruentec: 1712392-S012

Rotulación Muestra:	ENSAYO 1 TRATAMIENTO 3 REP 3	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d ⁿ⁾	
No. Reporte Gruentec:	1712392-S012	
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco:		
Acenaftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Acenafteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Antraceno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(a)pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(b)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(g,h,i)perileno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Benzo(k)fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Criseno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Dibenzo(a,h)antraceno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fenantreno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoranteno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Fluoreno mg/kg *	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Indeno(1,2,3 c,d) pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Naftaleno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22
Pireno mg/kg ^(1,2)	<0.1	EPA 8270 D / MM-S-22

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 20 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

n) n.d: fecha de muestreo no disponible, el laboratorio no se responsabiliza por el cumplimiento del tiempo máximo de análisis recomendado por los métodos de referencia.

INCERTIDUMBRE (U):

HAP Suelo = 30%;

Cálculo: $C \pm U$ (1u/100) en donde: C=valor medido; U= Incertidumbre %.

Anexo 17. Fotografías del ensayo

Fase de campo



Muestreo de suelos contaminados en el RIG 191 “Coca”, para análisis físico químico y cuantificación de TPHs y HAPs.



Muestreo de suelos no contaminados utilizados como testigo para el proyecto.



Disposición de los tratamientos del proyecto.



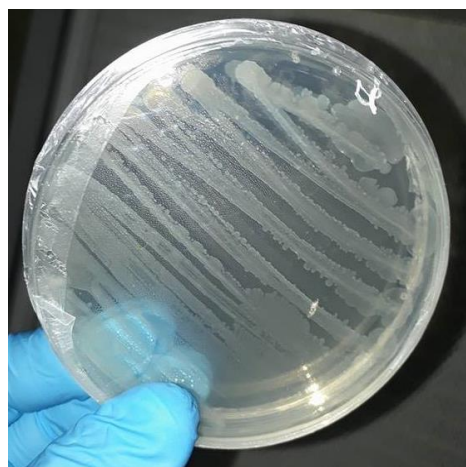
Toma de datos de las variables del proyecto.

Elaborado por: El autor, 2018.

Fase de laboratorio



Elaboración de la solución madre de cultivo.



Medio TSA, con crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* por el método de dilución.



Resiembras y masificación de *Pseudomonas fluorescens* en TSA.



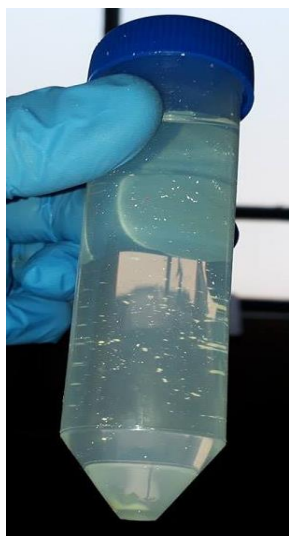
Siembra de *Pseudomonas fluorescens* en tubos falcon que contienen TSB.



Formación del Pelet que contienen a la masificación bacteriana en el fondo de los tubos falcon después de desechar el TSB.



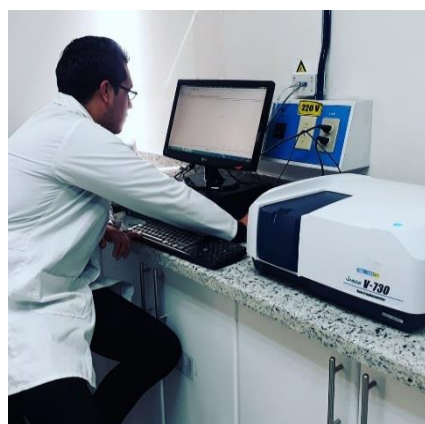
Suspensión del Pelet en agua destilada estéril.



Suspensión del Pelet en agua destilada estéril.



Traspaso de los tubos falcon a un Boeco de 1 L.



Toma de datos de las distintas concentraciones y absorbancias del inóculo en el espectrofotómetro.



Generación del inóculo a utilizarse en los distintos tratamientos.

Elaborado por: El autor, 2018.

Anexo 18. Datos de variable analizadas

Datos de pH

Fecha	T0			T1			T2			T3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
28/08/2017	8,97	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,97	8,97	8,97	8,97	8,97	8,97
29/08/2017	8,96	8,98	8,98	8,97	8,95	8,98	8,96	8,97	8,97	8,96	8,97	8,97
30/08/2017	8,96	8,98	8,98	8,94	8,91	8,80	8,94	8,93	8,96	8,94	8,93	8,96
31/08/2017	8,96	8,98	8,98	8,75	8,88	8,79	8,91	8,91	8,92	8,91	8,91	8,92
01/09/2017	8,96	8,98	8,97	8,69	8,87	8,71	8,91	8,90	8,88	8,91	8,90	8,88
02/09/2017	8,96	8,96	8,98	8,70	8,85	8,65	8,90	8,88	8,86	8,90	8,88	8,86
03/09/2017	8,95	8,94	8,96	8,61	8,70	8,61	8,89	8,88	8,80	8,80	8,72	8,88
04/09/2017	8,95	8,94	8,94	8,60	8,50	8,60	8,86	8,87	8,79	8,69	8,68	8,84
05/09/2017	8,94	8,93	8,90	8,48	8,49	8,56	8,88	8,83	8,72	8,51	8,52	8,75
06/09/2017	8,92	8,93	8,88	8,46	8,22	8,51	8,72	8,72	8,69	8,42	8,45	8,62
07/09/2017	8,90	8,92	8,86	8,44	8,18	8,53	8,60	8,71	8,59	8,31	8,36	8,51
08/09/2017	8,90	8,90	8,83	8,22	8,21	8,54	8,54	8,65	8,51	8,15	8,20	8,42
09/09/2017	8,90	8,88	8,83	8,17	8,19	8,49	8,45	8,46	8,50	8,05	8,15	8,35
10/09/2017	8,90	8,87	8,83	8,12	8,20	8,20	8,43	8,42	8,50	8,01	8,12	8,21
11/09/2017	9,00	9,00	9,00	8,09	8,17	8,14	8,21	8,40	8,49	7,95	8,09	8,12
12/09/2017	9,01	9,01	9,00	8,06	8,09	8,00	8,01	8,15	8,41	7,85	8,01	8,11
13/09/2017	9,01	9,01	9,00	8,01	8,11	7,95	7,95	8,09	8,25	7,83	7,95	8,03
14/09/2017	9,01	9,01	9,00	8,01	8,08	7,91	7,85	7,98	8,12	7,75	7,91	7,94
15/09/2017	9,01	9,01	9,00	8,00	7,95	7,90	7,81	7,91	7,99	7,71	7,82	7,91
16/09/2017	9,01	9,01	9,00	8,01	7,96	7,91	7,81	7,86	7,95	7,69	7,79	7,88
17/09/2017	9,00	9,01	9,00	7,98	7,98	7,84	7,69	7,76	7,86	7,68	7,72	7,70
18/09/2017	9,00	9,01	9,00	7,91	7,89	7,84	7,65	7,70	7,79	7,58	7,70	7,69

19/09/2017	9,00	9,01	9,00	7,89	7,88	7,84	7,60	7,62	7,62	7,52	7,62	7,51
20/09/2017	9,00	9,01	9,00	7,87	7,86	7,84	7,60	7,62	7,62	7,51	7,61	7,50
21/09/2017	9,00	8,97	9,00	7,86	7,86	7,84	7,60	7,62	7,62	7,51	7,60	7,40
22/09/2017	8,97	8,97	9,00	7,86	7,86	7,84	7,60	7,62	7,62	7,51	7,60	7,40
23/09/2017	8,97	8,99	9,00	7,84	7,85	7,84	7,60	7,60	7,60	7,51	7,60	7,40
24/09/2017	8,97	8,99	9,00	7,84	7,85	7,84	7,59	7,60	7,60	7,51	7,60	7,40
25/09/2017	8,97	8,99	9,00	7,84	7,85	7,83	7,59	7,60	7,60	7,50	7,57	7,40
26/09/2017	8,97	8,99	9,00	7,82	7,84	7,83	7,58	7,59	7,60	7,50	7,56	7,40
27/09/2017	8,97	8,99	8,98	7,82	7,83	7,82	7,58	7,59	7,59	7,50	7,54	7,40
28/09/2017	8,97	8,98	8,98	7,80	7,83	7,82	7,58	7,59	7,59	7,50	7,56	7,40
29/09/2017	8,96	8,98	8,98	7,79	7,81	7,82	7,58	7,59	7,59	7,50	7,55	7,40
30/09/2017	8,96	8,98	8,98	7,79	7,80	7,82	7,56	7,57	7,59	7,50	7,56	7,40
01/10/2017	8,96	8,98	8,98	7,79	7,80	7,81	7,55	7,57	7,59	7,50	7,54	7,40
02/10/2017	8,96	8,98	8,97	7,78	7,78	7,78	7,54	7,57	7,55	7,49	7,54	7,40
03/10/2017	8,96	8,96	8,98	7,78	7,79	7,77	7,56	7,57	7,54	7,50	7,56	7,40
04/10/2017	8,95	8,94	8,96	7,76	7,83	7,77	7,56	7,55	7,50	7,49	7,54	7,40
05/10/2017	8,95	8,94	8,94	7,76	7,83	7,76	7,56	7,53	7,51	7,49	7,55	7,40
06/10/2017	8,94	8,93	8,90	7,79	7,82	7,77	7,55	7,50	7,52	7,48	7,55	7,40
07/10/2017	8,92	8,93	8,88	7,79	7,80	7,77	7,54	7,49	7,50	7,48	7,50	7,40
08/10/2017	8,90	8,92	8,86	7,77	7,80	7,77	7,51	7,42	7,50	7,48	7,50	7,31
09/10/2017	8,90	8,90	8,83	7,78	7,78	7,78	7,50	7,40	7,50	7,48	7,50	7,31
10/10/2017	8,90	8,88	8,83	7,75	7,79	7,77	7,49	7,40	7,50	7,48	7,50	7,31
11/10/2017	8,90	8,87	8,83	7,82	7,83	7,82	7,58	7,59	7,50	7,48	7,50	7,31
12/10/2017	8,86	8,86	8,83	7,80	7,83	7,82	7,58	7,59	7,50	7,48	7,50	7,31
13/10/2017	8,86	8,87	8,83	7,79	7,81	7,82	7,58	7,59	7,50	7,48	7,50	7,31
14/10/2017	8,84	8,85	8,83	7,79	7,80	7,82	7,56	7,57	7,50	7,48	7,50	7,31
15/10/2017	8,83	8,83	8,83	7,79	7,80	7,81	7,55	7,57	7,50	7,48	7,50	7,31

16/10/2017	8,84	8,84	8,82	7,78	7,78	7,78	7,54	7,57	7,50	7,48	7,54	7,31
17/10/2017	8,84	8,85	8,83	7,78	7,78	7,77	7,56	7,57	7,50	7,48	7,56	7,31
18/10/2017	8,83	8,84	8,83	7,76	7,78	7,77	7,56	7,55	7,50	7,48	7,54	7,31
19/10/2017	8,83	8,85	8,83	7,76	7,78	7,76	7,56	7,53	7,50	7,48	7,50	7,31
20/10/2017	8,84	8,84	8,83	7,79	7,78	7,77	7,55	7,50	7,50	7,48	7,50	7,28
21/10/2017	8,83	8,82	8,83	7,79	7,78	7,77	7,54	7,49	7,50	7,48	7,50	7,28
22/10/2017	8,84	8,80	8,83	7,77	7,78	7,77	7,51	7,42	7,47	7,48	7,50	7,28
23/10/2017	8,84	8,82	8,82	7,78	7,78	7,78	7,50	7,40	7,45	7,48	7,50	7,28
24/10/2017	8,83	8,80	8,83	7,75	7,78	7,77	7,49	7,40	7,41	7,48	7,50	7,28
25/10/2017	8,84	8,84	8,82	7,78	7,78	7,78	7,45	7,38	7,55	7,48	7,49	7,28
26/10/2017	8,84	8,85	8,83	7,78	7,78	7,77	7,42	7,37	7,54	7,47	7,47	7,12
27/10/2017	8,83	8,84	8,83	7,76	7,78	7,77	7,39	7,37	7,50	7,42	7,40	7,12
28/10/2017	8,83	8,85	8,83	7,76	7,78	7,76	7,38	7,37	7,51	7,30	7,30	7,12
29/10/2017	8,84	8,84	8,83	7,70	7,78	7,73	7,38	7,35	7,52	7,25	7,21	7,12
30/10/2017	8,83	8,82	8,83	7,64	7,77	7,77	7,38	7,35	7,51	7,20	7,16	7,01
31/10/2017	8,83	8,82	8,82	7,60	7,60	7,60	7,35	7,35	7,35	7,14	7,10	7,01
01/11/2017	8,83	8,82	8,82	7,60	7,60	7,60	7,28	7,28	7,25	7,08	7,02	6,91
02/11/2017	8,80	8,82	8,82	7,60	7,60	7,60	7,28	7,28	7,25	7,04	6,92	6,83
03/11/2017	8,80	8,82	8,82	7,50	7,60	7,60	7,14	7,14	7,25	6,91	6,87	6,64
04/11/2017	8,80	8,81	8,81	7,50	7,50	7,50	7,14	7,10	7,20	6,90	6,80	6,50
05/11/2017	8,80	8,81	8,81	7,50	7,50	7,50	7,14	7,10	7,14	6,81	6,69	6,50
06/11/2017	8,80	8,81	8,81	7,50	7,50	7,50	7,11	7,10	7,09	6,80	6,58	6,50
PROMEDIO	8,92	8,93	8,91	7,98	8,00	8,00	7,82	7,85	7,87	7,68	7,71	7,70

Elaborado por: El autor, 2018.

Datos de variación de pH en tiempo por semana

TIEMPO POR SEMANA	T0	T1	T2	T3
7 Días	8,98	8,98	8,97	8,97
	8,97	8,97	8,97	8,97
	8,97	8,88	8,94	8,94
	8,97	8,81	8,91	8,91
	8,97	8,76	8,90	8,90
	8,97	8,73	8,88	8,88
	8,95	8,64	8,86	8,80
7 Días	8,94	8,57	8,84	8,74
	8,92	8,51	8,81	8,59
	8,91	8,40	8,71	8,50
	8,89	8,38	8,63	8,39
	8,88	8,32	8,57	8,26
	8,87	8,28	8,47	8,18
	8,87	8,17	8,45	8,11
7 Días	9,00	8,13	8,37	8,05
	9,01	8,05	8,19	7,99
	9,01	8,02	8,10	7,94
	9,01	8,00	7,98	7,87
	9,01	7,95	7,90	7,81
	9,01	7,96	7,87	7,79
	9,00	7,93	7,77	7,70
7 Días	9,00	7,88	7,71	7,66
	9,00	7,87	7,61	7,55

	9,00	7,86	7,61	7,54
	8,99	7,85	7,61	7,50
	8,98	7,85	7,61	7,50
	8,99	7,84	7,60	7,50
	8,99	7,84	7,60	7,50
7 Días	8,99	7,84	7,60	7,49
	8,99	7,83	7,59	7,49
	8,98	7,82	7,59	7,48
	8,98	7,82	7,59	7,49
	8,97	7,81	7,59	7,48
	8,97	7,80	7,57	7,49
	8,97	7,80	7,57	7,48
7 Días	8,97	7,78	7,55	7,48
	8,97	7,78	7,56	7,49
	8,95	7,79	7,54	7,48
	8,94	7,78	7,53	7,48
	8,92	7,79	7,52	7,48
	8,91	7,79	7,51	7,46
	8,89	7,78	7,48	7,43
7 Días	8,88	7,78	7,47	7,43
	8,87	7,77	7,46	7,43
	8,87	7,82	7,56	7,43
	8,85	7,82	7,56	7,43
	8,85	7,81	7,56	7,43
	8,84	7,80	7,54	7,43
	8,83	7,80	7,54	7,43
7 Días	8,83	7,78	7,54	7,44

	8,84	7,78	7,54	7,45
	8,83	7,77	7,54	7,44
	8,84	7,77	7,53	7,43
	8,84	7,78	7,52	7,42
	8,83	7,78	7,51	7,42
	8,82	7,77	7,47	7,42
7 Días	8,83	7,78	7,45	7,42
	8,82	7,77	7,43	7,42
	8,83	7,78	7,46	7,42
	8,84	7,78	7,44	7,35
	8,83	7,77	7,42	7,31
	8,84	7,77	7,42	7,24
	8,84	7,74	7,42	7,19
7 Días	8,83	7,73	7,41	7,12
	8,82	7,60	7,35	7,08
	8,82	7,60	7,27	7,05
	8,81	7,57	7,18	6,81
	8,81	7,50	7,15	6,73
	8,81	7,50	7,13	6,67
	8,81	7,50	7,10	6,63

Elaborado por: El autor, 2018.

Datos de variación de pH inicial y finales

TRATAMIENTOS	pH inicial	pH final	Reducción Total pH	TIEMPO
T0	8,98	8,81	0,17	70 Días
T1	8,98	7,5	1,48	
T2	8,97	7,1	1,87	
T3	8,97	6,63	2,34	

Elaborado por: El autor, 2018.

Datos de Conductividad eléctrica (dS/m)

Fecha	T0(dS/m)			T1(dS/m)			T2(dS/m)			T3(dS/m)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
28/08/2017	6,85	6,85	6,85	6,85	6,85	6,85	6,90	6,90	6,90	6,91	6,91	6,91
29/08/2017	6,85	6,85	6,85	6,82	6,81	6,81	6,82	6,82	6,81	6,63	6,72	6,63
30/08/2017	6,85	6,85	6,85	6,80	6,81	6,80	6,80	6,81	6,80	6,50	6,63	6,50
31/08/2017	6,85	6,85	6,85	6,75	6,80	6,72	6,75	6,80	6,72	6,42	6,50	6,42
01/09/2017	6,84	6,85	6,85	6,72	6,75	6,72	6,72	6,75	6,72	6,40	6,42	5,92
02/09/2017	6,83	6,85	6,85	6,63	6,72	6,63	6,63	6,72	6,63	6,38	5,61	5,80
03/09/2017	6,83	6,85	6,85	6,50	6,63	6,50	6,50	6,63	6,50	6,21	5,52	5,61
04/09/2017	6,83	6,84	6,84	6,42	6,50	6,42	6,42	6,50	6,42	5,99	5,41	5,52
05/09/2017	6,83	6,83	6,83	6,40	6,42	5,92	6,40	6,42	5,92	5,92	5,39	5,41
06/09/2017	6,83	6,83	6,83	6,38	5,61	5,80	6,38	5,61	5,80	5,80	5,31	5,39
07/09/2017	6,83	6,83	6,83	6,21	5,52	5,61	6,21	5,52	5,61	5,71	5,28	5,31
08/09/2017	6,83	6,83	6,83	5,99	5,41	5,52	5,99	5,41	5,52	5,57	5,22	5,28
09/09/2017	6,83	6,83	6,83	5,92	5,39	5,41	5,92	5,39	5,41	5,50	5,48	5,31
10/09/2017	6,80	6,83	6,83	5,80	5,31	5,39	5,80	5,31	5,39	5,39	5,42	5,21
11/09/2017	6,80	6,83	6,83	5,61	5,28	5,31	5,71	5,28	5,31	5,31	5,36	5,26
12/09/2017	6,80	6,83	6,83	5,52	5,22	5,28	5,57	5,22	5,28	5,21	5,21	5,12
13/09/2017	6,80	6,82	6,81	5,41	5,11	5,22	5,50	5,48	5,31	5,26	5,22	5,10
14/09/2017	6,80	6,82	6,81	5,39	5,08	5,11	5,39	5,42	5,21	5,10	5,20	5,01
15/09/2017	6,80	6,82	6,81	5,31	5,06	5,04	5,31	5,36	5,26	4,99	5,02	4,97
16/09/2017	6,80	6,82	6,81	5,28	5,04	5,01	5,21	5,21	5,12	4,92	4,99	4,89
17/09/2017	6,79	6,82	6,81	5,15	5,01	4,99	5,26	5,22	5,10	4,69	4,81	4,63
18/09/2017	6,79	6,80	6,81	5,10	4,99	4,92	5,10	5,20	5,01	4,51	4,39	4,20
19/09/2017	6,79	6,80	6,80	5,06	4,97	4,91	4,99	5,02	4,97	4,10	4,39	4,20
20/09/2017	6,79	6,80	6,80	5,00	4,97	4,88	4,90	4,96	4,97	4,10	4,39	4,20
21/09/2017	6,79	6,80	6,80	4,95	4,97	4,81	4,81	4,03	4,97	4,10	4,39	4,20

22/09/2017	6,79	6,80	6,80	4,92	4,96	4,78	4,73	4,90	4,70	4,10	4,39	4,20
23/09/2017	6,79	6,80	6,80	4,90	4,93	4,76	4,68	4,88	4,70	4,10	4,39	4,20
24/09/2017	6,79	6,77	6,80	4,83	4,92	4,71	6,65	4,84	4,70	4,10	4,39	4,20
25/09/2017	6,79	6,75	6,80	4,74	4,90	4,61	4,65	4,82	4,70	4,10	4,28	4,20
26/09/2017	6,78	6,75	6,78	4,70	4,88	4,60	4,65	4,73	4,70	4,06	4,26	4,20
27/09/2017	6,78	6,75	6,77	4,62	4,88	4,60	4,65	4,70	4,70	4,03	4,16	4,14
28/09/2017	6,78	6,75	6,77	4,60	4,88	4,58	4,65	4,68	4,70	4,01	4,10	4,09
29/09/2017	6,77	6,75	6,77	4,60	4,88	4,58	4,65	4,66	4,65	4,00	4,03	4,01
30/09/2017	6,77	6,75	6,77	4,59	4,80	4,53	4,60	4,60	4,60	4,00	4,01	4,00
01/10/2017	6,77	6,74	6,77	4,51	4,74	4,53	4,60	4,58	4,56	4,00	4,00	3,99
02/10/2017	6,77	6,75	6,77	4,53	4,88	4,58	4,65	4,66	4,65	3,91	3,91	3,91
03/10/2017	6,77	6,74	6,76	4,52	4,80	4,53	4,60	4,60	4,60	3,91	3,91	3,91
04/10/2017	6,77	6,74	6,76	4,51	4,74	4,53	4,60	4,58	4,56	3,91	3,91	3,91
05/10/2017	6,77	6,73	6,74	4,49	4,71	4,52	4,56	4,56	4,55	3,91	3,91	3,91
06/10/2017	6,76	6,73	6,73	4,48	4,68	4,51	4,53	4,88	4,58	3,91	3,91	3,91
07/10/2017	6,76	6,72	6,71	4,47	4,66	4,50	4,52	4,80	4,53	3,91	3,91	3,91
08/10/2017	6,75	6,71	6,71	4,42	4,65	4,47	4,51	4,74	4,53	3,93	3,93	3,93
09/10/2017	6,75	6,75	6,77	4,53	4,88	4,58	4,65	4,66	4,65	3,93	3,93	3,93
10/10/2017	6,75	6,74	6,76	4,52	4,80	4,53	4,60	4,60	4,60	3,93	3,93	3,93
11/10/2017	6,74	6,74	6,76	4,51	4,74	4,53	4,60	4,58	4,56	3,93	3,93	3,93
12/10/2017	6,74	6,73	6,74	4,49	4,71	4,52	4,56	4,56	4,55	3,93	3,93	3,93
13/10/2017	6,74	6,73	6,73	4,48	4,68	4,51	4,53	4,88	4,58	3,93	3,93	3,93
14/10/2017	6,74	6,72	6,71	4,47	4,66	4,50	4,52	4,80	4,53	3,91	3,91	3,91
15/10/2017	6,74	6,71	6,71	4,42	4,65	4,47	4,51	4,74	4,53	3,90	3,90	3,90
16/10/2017	6,73	6,70	6,70	4,40	4,60	4,40	4,51	4,70	4,52	3,83	3,83	3,83
17/10/2017	6,73	6,70	6,70	4,40	4,60	4,40	4,51	4,70	4,52	3,83	3,83	3,83
18/10/2017	6,74	6,73	6,73	4,48	4,68	4,51	4,53	4,17	4,58	3,93	3,93	3,93
19/10/2017	6,74	6,72	6,71	4,47	4,66	4,50	4,52	4,17	4,41	3,91	3,91	3,91

20/10/2017	6,74	6,71	6,71	4,42	4,65	4,47	4,51	4,17	4,41	3,90	3,90	3,90
21/10/2017	6,73	6,70	6,70	4,40	4,60	4,40	3,90	4,17	4,41	3,83	3,83	3,83
22/10/2017	6,73	6,70	6,70	4,40	4,60	4,40	3,90	4,17	4,41	3,83	3,83	3,83
23/10/2017	6,70	6,68	6,67	4,38	4,50	4,30	3,90	4,17	4,41	3,67	3,67	3,30
24/10/2017	6,70	6,68	6,67	4,35	4,50	4,30	3,90	4,17	4,35	3,57	3,57	3,30
25/10/2017	6,70	6,67	6,67	3,99	4,50	4,30	3,90	4,17	4,30	3,47	3,47	3,30
26/10/2017	6,70	6,67	6,67	3,99	3,99	4,27	3,90	4,17	4,27	3,40	3,39	3,30
27/10/2017	6,70	6,67	6,67	3,99	3,99	3,97	3,90	4,17	4,27	3,30	3,30	3,30
28/10/2017	6,70	6,65	6,67	3,99	3,99	3,97	3,90	3,91	3,91	3,30	3,30	3,30
29/10/2017	6,70	6,65	6,91	3,99	3,99	3,97	3,90	3,90	3,90	3,19	3,30	3,30
30/10/2017	6,70	6,65	6,67	3,90	3,80	3,97	3,91	3,92	3,85	3,19	3,30	3,29
31/10/2017	6,70	6,65	6,67	3,90	3,80	3,97	3,91	3,92	3,85	3,19	3,30	3,29
01/11/2017	6,70	6,65	6,67	3,90	3,80	3,97	3,91	3,92	3,80	2,94	2,94	2,94
02/11/2017	6,70	6,65	6,67	3,90	3,80	3,97	3,91	3,92	3,85	2,94	2,90	2,90
03/11/2017	6,70	6,65	6,67	3,90	3,80	3,97	3,91	3,92	3,85	2,94	2,90	2,90
04/11/2017	6,70	6,65	6,67	3,90	3,80	3,97	3,91	3,92	3,85	2,90	2,90	2,90
05/11/2017	6,70	6,65	6,67	3,90	3,80	3,97	3,91	3,92	3,85	2,90	2,90	2,90
06/11/2017	6,70	6,65	6,67	3,90	3,80	3,97	3,91	3,92	3,85	2,90	2,90	2,90
PROMEDIO	6,77	6,76	6,77	5,02	5,06	4,94	5,03	5,00	4,98	4,49	4,48	4,41

Elaborado por: El autor, 2018.

Datos de Temperatura (°C).

Fecha	T0(°C)			T1(°C)			T2(°C)			T3(°C)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
28/08/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00
29/08/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
30/08/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
31/08/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
01/09/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
02/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
03/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
04/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
05/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
06/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	19,00
07/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	19,00
08/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00
09/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	19,00	20,00	19,00	19,00	19,00	19,00	20,00
10/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	20,00
11/09/2017	20,00	19,00	20,00	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	20,00	19,00	19,00	20,00
12/09/2017	20,00	19,00	19,00	19,00	19,00	20,00	19,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
13/09/2017	20,00	19,00	19,00	19,00	19,00	20,00	19,00	19,00	20,00	19,00	19,00	20,00
14/09/2017	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	19,00	19,00	20,00
15/09/2017	19,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	19,00	19,00	20,00
16/09/2017	19,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00
17/09/2017	19,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00
18/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00
19/09/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
20/09/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
21/09/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00

21/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
22/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
23/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
24/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
25/10/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00
26/10/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
27/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
28/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
29/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
30/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
31/10/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
01/11/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00
02/11/2017	20,00	19,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
03/11/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
04/11/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
05/11/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
06/11/2017	20,00	20,00	20,00	20,00	19,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
PROMEDIO	19,88	19,44	19,91	19,88	19,19	19,92	19,88	19,52	19,94	19,81	19,58	19,95

Elaborado por: El autor, 2018.

Datos de Humedad (%).

fecha	T0 (%)			T1 (%)			T2 (%)			T3 (%)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
28/08/2017	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
29/08/2017	75,00	75,00	75,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
30/08/2017	75,00	75,00	75,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
31/08/2017	70,00	70,00	70,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
01/09/2017	70,00	70,00	70,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
02/09/2017	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
03/09/2017	70,00	70,00	70,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
04/09/2017	70,00	70,00	70,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
05/09/2017	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
06/09/2017	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
07/09/2017	65,00	65,00	65,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
08/09/2017	65,00	65,00	65,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
09/092017	65,00	65,00	65,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
10/09/2017	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
11/09/2017	60,00	49,00	49,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
12/09/2017	60,00	49,00	49,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
13/09/2017	60,00	49,00	49,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
14/09/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
15/09/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00

16/09/2017	50,00	50,00	50,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
17/09/2017	50,00	50,00	50,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
18/09/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
19/09/2017	50,00	50,00	50,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
20/09/2017	50,00	50,00	50,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
21/09/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
22/09/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
23/09/2017	50,00	50,00	50,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
24/09/2017	50,00	50,00	50,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
25/09/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	70,00	70,00	70,00
26/09/2017	50,00	50,00	50,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	65,00	65,00	65,00
27/09/2017	50,00	50,00	50,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	75,00	75,00	75,00
28/09/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
29/09/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	70,00	70,00	70,00
30/09/2017	50,00	50,00	50,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	65,00	65,00	65,00
01/10/2017	50,00	50,00	50,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
02/10/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	70,00	70,00	70,00
03/10/2017	50,00	50,00	50,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	65,00	65,00	65,00
04/10/2017	50,00	50,00	50,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	75,00	75,00	75,00
05/10/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
06/10/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	70,00	70,00	70,00
07/10/2017	50,00	50,00	50,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	65,00	65,00	65,00

30/10/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	70,00	70,00	70,00
31/10/2017	50,00	50,00	50,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	65,00	65,00	65,00
01/11/2017	50,00	50,00	50,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	75,00	75,00	75,00
02/11/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
03/11/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	70,00	70,00	70,00
04/11/2017	50,00	50,00	50,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	75,00	75,00	75,00
05/11/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
06/11/2017	50,00	50,00	50,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	70,00	70,00	70,00
PROMEDIO	54,69	54,17	54,17	70,78	70,78	70,78	70,78	70,78	70,78	69,92	69,92	69,92

Elaborado por: El autor, 2018.

Medición de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en peso seco Tratamientos y Repeticiones

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en peso seco (mg/kg).	Iniciales	Finales T0 (R1)	Finales T0 (R2)	Finales T0 (R3)	Finales T1 (R1)	Finales T1 (R2)	Finales T1 (R3)	Finales T2 (R1)	Finales T2 (R2)	Finales T2 (R3)	Finales T3 (R1)	Finales T3 (R2)	Finales T3 (R3)
Acenaftaleno	8,2*	5,3	6,3	9,5	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Acenafteno	<0,5	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Antraceno	<0,5	8,2	11	13	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo (a) antraceno	7,3*	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo (a) pireno	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo (b) fluoranteno	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo (g,h,i) perileno	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo (k) fluoranteno	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Criseno	1,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Dibenzo (a,h) antraceno	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fenantreno	32*	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fluoranteno	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fluoreno	<0,5	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Indenol (1,2,3c,d) pireno	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Naftaleno	65*	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pireno	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
PROMEDIO	22,76	6,75	8,65	11,25	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Nota: Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

Fuente:(Gruntect Environmental Services, 2018).

